

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6800854号
(P6800854)

(45) 発行日 令和2年12月16日(2020.12.16)

(24) 登録日 令和2年11月27日(2020.11.27)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 5/071 (2010.01) C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 1/00 (2006.01) C 1 2 N 1/00 B

請求項の数 15 (全 114 頁)

(21) 出願番号	特願2017-532641 (P2017-532641)	(73) 特許権者	509087759
(86) (22) 出願日	平成27年12月9日 (2015.12.9)		ヤンセン バイオテック, インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2017-537649 (P2017-537649A)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州19044
(43) 公表日	平成29年12月21日 (2017.12.21)		4 ホーシヤム・リツジビュードライブ800/850
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/064713	(74) 代理人	100092783
(87) 国際公開番号	W02016/100035		弁理士 小林 浩
(87) 国際公開日	平成28年6月23日 (2016.6.23)	(74) 代理人	100095360
審査請求日	平成30年12月7日 (2018.12.7)		弁理士 片山 英二
(31) 優先権主張番号	62/094,509	(74) 代理人	100093676
(32) 優先日	平成26年12月19日 (2014.12.19)		弁理士 小林 純子
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞の懸濁培養

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

前腸内胚葉細胞を腭内胚葉細胞に分化させるための方法であって、腭臓転写因子1サブユニット (PTF1A)、NeuroG3 (NGN3)、又はPTF1AとNGN3との両方の発現を防止又は阻害するのに十分であるpH7.0~7.2の条件下で少なくとも24時間、懸濁培養において前記前腸内胚葉細胞を培養する工程を含む、方法。

【請求項2】

1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

2,000,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記腭内胚葉細胞が、PTF1A及びNGN3の発現に対して陰性である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

PTF1A及びNGN3の発現に対して陰性である前記腭内胚葉細胞を、PDX1及びNKX6.1の共発現に対して陽性であり、かつPTF1Aの発現に対して陽性である細胞を96%以上有する腭内胚葉細胞の集団に富化させることを更に含む、請求項4に記載の方法。

【請求項 6】

P T F 1 A 及び N G N 3 の発現に対して陰性である前記膵内胚葉細胞を、P T F 1 A 発現に対して陽性の細胞が産生される分化ステージを含まずに膵内分泌腺細胞に分化させることを更に含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記膵内胚葉細胞を、T G F - シグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上を用いて培養することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 8】

前記膵内胚葉細胞を、B M P シグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上を用いて培養することを含む、請求項 4 に記載の方法。

10

【請求項 9】

前記膵内胚葉細胞を、ソニックヘッジホッグシグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上を用いて培養することを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

前記ソニックヘッジホッグシグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上のうちの 1 つが S A N T - 1 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記ソニックヘッジホッグシグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上のうちの 1 つがシクロパミンである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記膵内胚葉細胞を、T G F シグナル伝達、B M P シグナル伝達および/またはソニックヘッジホッグシグナル伝達の阻害剤の 1 つ以上を用いて培養することを含む、請求項 4 に記載の方法。

20

【請求項 13】

前記懸濁培養がバイオリクター内である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記懸濁培養が懸濁液タンクバイオリクター内である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前腸内胚葉細胞を膵内胚葉細胞に分化させるための方法であって、膵臓転写因子 1 サブユニット (P T F 1 A)、NeuroG3 (N G N 3)、又は P T F 1 A と N G N 3 との両方の発現を防止又は阻害するのに十分である $pH 7.0 \sim 7.2$ の条件下で少なくとも 24 時間、懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養する工程を含み、

30

前記培養が、 $1,500,000$ 細胞/mL 以上の細胞濃度、及び $0.5 \sim 1.0 \mu M$ のレチノイド濃度を含むものであり、

前記培養する工程が、T G F - シグナル伝達及び B M P シグナル伝達の阻害、ブロック、活性化、又は刺激のうち 1 つ又は 2 つ以上を行う成分がないとき、かつソニックヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤がないときに実行される、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願の相互参照)

本願は、2014年12月19日に出願された、米国特許仮出願第 62 / 094,509 号の利益を主張するものであり、参照によりその全体があらゆる目的で本明細書に組み込まれる。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、多能性細胞の、膵内分泌前駆細胞及び膵内分泌細胞への分化に関する。特に、本発明は、分化プロセスにおいて pH、細胞濃度、及びレチノイド濃度の制御を使用して、膵内分泌前駆細胞を共発現する N K X 6.1 及び P D X 1 の均質集団の生成を容易にする方法に関するものであり、膵内分泌前駆細胞は、生体外で更に分化させたとき、P D

40

50

X1、NKX6.1、インスリン、及びMAFAを共発現する膵内分泌細胞の、従来の分化方法と比べてより成熟した集団を生じさせる。

【背景技術】

【0003】

I型真性糖尿病の細胞補充療法の進歩及び移植可能なランゲルハンス島の不足により、生着に適したインスリン産生細胞、すなわち細胞の供給源の開発に注目が集まっている。1つの手法として、胚性幹細胞などの多能性幹細胞から機能的細胞を生成するものがある。

【0004】

脊椎動物の胚発生では、多能性細胞は、原腸形成として知られるプロセスにおいて3つの胚葉（外胚葉、中胚葉、及び内胚葉）から構成される細胞群を生じる。例えば、甲状腺、胸腺、膵臓、腸、及び肝臓などの組織は、内胚葉から中間ステージを経て発達する。このプロセスにおける中間ステージは、胚体内胚葉（definitive endoderm）の形成である。

10

【0005】

原腸形成の終了までに、内胚葉は、内胚葉の前部、中間、及び後部の領域を特異的にマークする因子のパネルの発現によって認識することができる前部 - 後部ドメインに分割される。例えば、HHEX及びSOX2は内胚葉の前領域を特定し、CDX1、2及び4は後老域を特定する。

【0006】

20

内胚葉組織の移行は、内胚葉を腸管の領域化に役立つ異なった中胚葉組織に近接させる。これは、線維芽細胞増殖因子（「FGF」）、ウイングレス型MMTV組込部位（「WNTS」）、形質転換増殖因子（「TGF-」）、レチノイン酸（「RA」）、及び骨形成タンパク質（「BMP」）リガンド、並びにそれらのアンタゴニストなどの分泌因子の過多によって達成される。例えば、FGF4及びBMPは推定後腸内胚葉においてCDX2の発現を促進し、前方の遺伝子HHEX及びSOX2の発現を阻害することが報告されている（2000 Development, 127:1563~1567）。WNTシグナル伝達はまた、後腸の発達を促進し、前腸の運命を阻害するために、FGFシグナル伝達と平行して作用することが示されている（2007 Development, 134:2207~2217）。最後に、間葉によって分泌されるレチノイン酸は、前腸 - 後腸の境界を調節する（2002 Curr Biol, 12:1215~1220）。

30

【0007】

特異的転写因子の発現レベルは、組織のアイデンティティを指定するために使用できる可能性がある。原腸管への胚体内胚葉の形質転換中に、腸管は、制限された遺伝子発現パターンにより分子レベルで観察することができる広いドメインに領域化される。例えば、腸管で領域化された膵臓ドメインは、PDX1の非常に高い発現並びにCDX2及びSOX2の非常に低い発現を示す。PDX1、NKX6.1、膵臓転写因子1サブユニット（「PTF1A」）、及びNKX2.2は膵臓組織で高く発現し、また、CDX2の発現は腸組織で高い。

【0008】

40

膵臓の形成は、胚体内胚葉の膵臓内胚葉への分化により生じる。背側と腹側の膵臓ドメインは、前腸上皮から生じる。また、前腸は、食道、気管、肺、甲状腺、胃、肝臓、膵臓、胆管系を生じさせる。

【0009】

膵臓内胚葉の細胞は膵臓 - 十二指腸ホメオボックス遺伝子PDX1を発現する。PDX1が存在しない場合、膵臓の発達は、腹側芽及び背側芽の形成より先に進行しない。したがって、PDX1の発現は、膵臓器官形成において重要な工程を示している。成熟した膵臓は、膵臓内胚葉の分化から生じる外分泌組織及び内分泌組織の両方を含有する。

【0010】

D'Amourらは、高濃度のアクチビン及び低血清の存在下でのヒト胚性幹細胞由来

50

の胚体内胚葉の濃縮培地の産生を記述している (Nature Biotechnol 2005, 23: 1534~1541; 米国特許第7,704,738号)。マウスの腎臓被膜下でのこれらの細胞の移植は、報告によると、内胚葉組織の特徴を有する、より成熟した細胞への分化をもたらした (米国特許第7,704,738号)。ヒト胚性幹細胞由来の胚体内胚葉細胞は、FGF10及びレチノイン酸の添加後、PDX1陽性細胞に更に分化させることができる (米国特許出願公開第2005/0266554(A1)号)。免疫不全マウスの脂肪パッド中のこれら膵臓前駆細胞のその後の移植は、3~4ヶ月の成熟期の後に、機能的膵内分泌細胞の形成をもたらした (米国特許第7,993,920号及び米国特許第7,534,608号)。

【0011】

Fiskらは、ヒト胚性幹細胞からの膵島細胞の産生のためのシステムを報告している (米国特許第7,033,831号)。小分子阻害剤もまた、膵内分泌前駆細胞の誘導のために使用されている。例えば、TGF-受容体及びBMP受容体の小分子阻害剤 (Development 2011, 138: 861~871; Diabetes 2011, 60: 239~247) は、膵内分泌細胞の数を著しく増強するために使用されている。加えて、小分子活性化物質もまた、胚体内胚葉細胞又は膵臓前駆細胞を生成するために使用されている (Curr Opin Cell Biol 2009, 21: 727~732; Nature Chem Biol 2009, 5: 258~265)。

【0012】

多能性幹細胞などの前駆細胞を培養するためのプロトコルの改善において、大きな進歩がなされた。PCT公開第WO2007/026353(Amitら)は、二次元培養系における未分化状態でのヒト胚性幹細胞の維持を開示する。Ludwigら、2006 (Nature Biotechnology, 24: 185~7) は、マトリックス上でのヒト胚性幹細胞の培養のためのTeSR1画定培地を開示する。米国特許出願公開第2007/0155013号(Akaikeら)は、多能性幹細胞に接着するキャリアを使用して、懸濁液で多能性幹細胞を成長させる方法を開示し、同第2009/0029462号(Beardsleyら)は、マイクロキャリア又は細胞のカプセル化を使用して、懸濁液で多能性幹細胞を増殖する方法を開示する。PCT公開第WO 2008/015682号(Amitら)は、基質接着の欠ける培養状況下において、懸濁培養下でヒト胚性幹細胞を増殖させ、維持する方法を開示する。米国特許出願公開第2008/0159994号(Mantalarisら)は、三次元培養システムにおいてアルギン酸ビーズ内に封入されたヒト胚性幹細胞を培養する方法を開示する。

【0013】

Rezania et al. (Nature Biotechnology, 32: 1121~1133 (2014)), Pagliuca et al (Cell, 159: 428~439 (2014)) 及び米国特許第8,859,286号(Agulnick)を含む技術は、BMPバインダー (例えばノギン)、若しくは(6-(4-(2-(ピペリジン-1-イル)エトキシ)フェニル)-3-(ピリジン-4-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン、塩酸塩などのBMP受容体阻害剤などの成分を使用することによるBMPの直接ブロッキング、又はあるいは、TGF-ファミリーメンバーを追加して受容体を占有し、BMPシグナル伝達を間接的にブロックすることのどちらかによって、TGF-又はBMPのシグナル伝達を調節する成分の追加の必要性を教示する。最終的に、ソニックヘッジホッグのシグナル伝達の抑制はPDX1及びインスリンの発現を可能し得るため、ステージ3におけるSANT-1又はシクロパミンなどのソニックヘッジホッグ阻害剤の使用が有利であることが教示される (Hebrok et al, Genes & Development, 12: 1705~1713 (1998))。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

これらの進歩にもかかわらず、機能的内分泌細胞に分化し得る多能性幹細胞を三次元培

10

20

30

40

50

養系にて培養する改善された方法の必要性が、依然として残っている。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1A】実施例1の分化プロトコルの過程で時間（分化日数）に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからの酸素分圧のグラフである。

【図1B】実施例1の分化プロトコルの過程で時間（分化日数）に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからのグルコース濃度のグラフである。

【図1C】実施例1の分化プロトコルの過程で時間（分化日数）に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからの乳酸濃度のグラフである。

【図1D】実施例1の分化プロトコルの過程で時間（分化日数）に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからのpH濃度のグラフである。

10

【図2A】ステージ1からステージ5.1の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPDX1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2B】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2C】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPAX4の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

20

【図2D】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2E】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNEUROG3（NGN3）の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2F】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのABCC8の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2G】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンA（CHGA）の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

30

【図2H】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのG6PC2の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2I】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのIAPPの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2J】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

40

【図2K】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのGC6の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2L】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPTF1Aの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

【図2M】ステージ1からステージ5の1日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

50

【図3A】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPDX1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3B】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3C】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3D】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

10

【図3E】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのNEUROG3(NGN3)の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3F】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのSLC2A1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3G】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPAX4の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

20

【図3H】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPCSK2の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3I】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンA(CHGA)の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3J】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンB(CHGB)の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

30

【図3K】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程での膵臓ポリペプチドの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3L】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのPCSK1の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3M】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのG6PC2の発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図3N】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのグルカゴンの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

40

【図3O】ステージ5、3日目からステージ6の7日目までの実施例1の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(qRT-PCR)の結果のグラフである。

【図4】実施例1のプロトコルに従い分化され、CD9(X軸)と共染色されるCD184/CXCR4(Y軸)、及びCD99(X軸)と共染色されるCD184/CXCR4(Y軸)について染色された、ステージ1細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図5A】実施例1のプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、及びKi67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)につ

50

いて染色された、ステージ4細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図5B】実施例1のプロトコルに従い分化され、NKX2.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、及びAPC-A(Y軸)と共染色されるNEUROD1(X軸)について染色された、ステージ4細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図6A】実施例1、条件Aのプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)、及びグルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図6B】実施例1、条件Aのプロトコルに従い分化され、Ki67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、OCT4(Y軸)と共染色されるPAX6(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるNEUROD1(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、及びNKX6.1(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

10

【図7A】実施例1、条件Bのプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX2.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)、及びグルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図7B】実施例1、条件Bのプロトコルに従い分化され、Ki67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、OCT4(Y軸)と共染色されるPAX6(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるNEUROD1(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、及びNKX6.1(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

20

【図8A】実施例1、条件Cのプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX2.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)、及びグルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図8B】実施例1、条件Cのプロトコルに従い分化され、Ki67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、OCT4(Y軸)と共染色されるPAX6(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるNEUROD1(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、及びNKX6.1(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)について染色された、ステージ5細胞のFACSプロファイルのグラフである。

30

【図9A】実施例1、条件Aのプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX2.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、グルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)、及びインスリン(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフである。

40

【図9B】実施例1、条件Aのプロトコルに従い分化され、Ki67(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)、OCT4(Y軸)と共染色されるPAX6(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるNEUROD1(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、及びNKX6.1(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図10A】実施例1、条件Bのプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、NKX.2(Y軸)と共染色されるクロモグラニンA(X軸)、グルカゴン(Y軸)と共染色されるインスリン(X軸)、NKX6.1(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)、及びインスリン(Y軸)と共染色されるCペプチド(X軸)について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフで

50

ある。

【図10B】実施例1、条件Bのプロトコルに従い分化され、Ki67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、OCT4（Y軸）と共染色されるPAX6（X軸）、NKX6.1（Y軸）と共染色されるNEUROD1（X軸）、NKX6.1（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）、及びNKX6.1（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図11A】実施例1、条件Cのプロトコルに従い分化され、NKX6.1（Y軸）と共染色されるクロモグラニンA（X軸）、NKX.2（Y軸）と共染色されるクロモグラニンA（X軸）、グルカゴン（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）、NKX6.1（Y軸）と共染色されるCペプチド（X軸）、及びインスリン（Y軸）と共染色されるCペ

10

プチド（X軸）について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図11B】実施例1、条件Cのプロトコルに従い分化され、Ki67（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）、OCT4（Y軸）と共染色されるPAX6（X軸）、NKX6.1（Y軸）と共染色されるNEUROD1（X軸）、NKX6.1（Y軸）と共染色されるインスリン（X軸）、及びNKX6.1（Y軸）と共染色されるPDX1（X軸）について染色された、ステージ6細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図12】実施例1のプロトコルに従い分化された、ステージ4細胞（15日目）、ステージ5細胞（19及び22日目）、及びステージ6細胞（25及び29日目）のMAFAの発現に関する定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（qRT-PCR）の結果のグラフである。

20

【図13】ステージ6細胞の7日目におけるMAFAの発現の顕微鏡写真である。

【図14】実施例2のステージ3から4のpH、溶存酸素、及び細胞濃度の設定値のフローチャートである。

【図15A】実施例2に従い行われた分化について、ステージ3の開始からステージ4、3日目までのpHを連続監視する間のpH濃度を示す2つのグラフを示す。

【図15B】実施例2に従い行われた分化について、ステージ3の開始からステージ4、3日目までのDOを連続監視する間の溶存酸素濃度を示す2つのグラフを示す。

【図16A】実施例2に従い行われた分化について、ステージ3の開始からステージ4、3日目まで時間に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからのグルコース濃度のグラフである。

30

【図16B】実施例2に従い行われた分化について、ステージ3の開始からステージ4、3日目まで時間に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからの乳酸濃度のグラフである。

【図17】実施例2に従い行われた分化について、ステージ3の開始からステージ4、3日目まで時間に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからの細胞カウントのグラフである。

【図18A】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのPDX1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

40

【図18B】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18C】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのPAX4の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18D】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18E】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコ

50

ルの過程でのNEUROG3 (NGN3)の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18F】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのABCC8の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18G】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18H】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

10

【図18I】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのARXの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18J】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのグレリンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18K】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのIAPPの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18L】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのPTF1Aの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

20

【図18M】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図18N】ステージ3、1日目からステージ4の2日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNKX2.2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図19】ステージ3において7.0及び7.4のpH設定値を用いて、実施例2のプロトコルに従い分化され、NEUROD1(X軸)と共染色されるNKX6.1(Y軸)について染色された、ステージ3細胞のFACSプロファイルのグラフを示す。

30

【図20】ステージ3において7.0及び7.4のpH設定値を用いて、実施例2のプロトコルに従い分化され、NEUROD1(X軸)と共染色されるNKX6.1(Y軸)について染色された、ステージ4細胞のFACSプロファイルのグラフを示す。

【図21A】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNEUROG3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図21B】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

40

【図21C】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのNKX2.2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図21D】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのARXの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図21E】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図21F】ステージ4、2日目からステージ5の7日目までの実施例2の分化プロトコルの過程でのPCSK2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフであ

50

る。

【図 2 1 G】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での A B C C 8 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 H】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での G 6 P C 2 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 I】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

10

【図 2 1 J】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での I S L 1 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 K】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での S L C 2 A 1 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 L】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での S L C 3 0 A 8 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 M】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での N K X 6 . 1 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

20

【図 2 1 N】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での U C N 3 の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 O】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での M A F A の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 P】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での P P Y の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

30

【図 2 1 Q】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程でのグレリンの発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 R】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での G C G の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 1 S】ステージ 4、2 日目からステージ 5 の 7 日目までの実施例 2 の分化プロトコルの過程での S S T の発現に関するリアルタイム q R T - P C R の結果のグラフである。

【図 2 2】ステージ 6、7 日目の細胞におけるインスリン及び M A F A の発現の顕微鏡写真を示す。

【図 2 3】実施例 2 のプロトコルに従い分化され、N E U R O D 1 (Y 軸) と共染色される N K X 6 . 1 (X 軸)、細胞カウント (Y 軸) に対する N K X 6 . 1 (X 軸)、及び細胞カウント (Y 軸) に対する N E U R O D 1 (X 軸) について染色された、ステージ 5、6 日目の細胞の F A C S プロファイルのグラフを示す。上のグラフは条件 A に関連し、下は条件 C に関連する。

40

【図 2 4 A】実施例 3 に従いリアクター B、C、及び D で行われる分化について、ステージ 3 の開始からステージ 5 までの p H を連続監視する間の p H 濃度のグラフを示す。

【図 2 4 B】実施例 3 に従いリアクター B、C、及び D で行われる分化について、ステージ 3 の開始からステージ 5 までの D O を連続監視する間の溶存酸素濃度を表すグラフを示す。

【図 2 5】実施例 3 に従いリアクター B、C、及び D で行われる分化について、ステージ

50

3の開始からステージ5まで時間に応じてプロットされた毎日の培地サンプルからの細胞カウントのグラフである。

【図26A】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのPDX1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26B】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26C】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのPAX4の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

10

【図26D】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26E】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのNEUROG3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26F】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのABCC8の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

20

【図26G】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26H】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26I】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのARXの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26J】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのグレリンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

30

【図26K】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのIAPPの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26L】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのPFT1Aの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図26M】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

40

【図26N】ステージ3、1日目からステージ5の1日目までのリアクターB、C、及びDにおける実施例3の分化プロトコルの過程でのNKX2.2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27A】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのNEUROG3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27B】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

50

【図27C】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27D】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27E】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのGCGの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27F】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのIAPPの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである

10

。【図27G】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのISL1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである

。【図27H】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのMAFBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである

。【図27I】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程での膵臓ポリペプチドの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

20

【図27J】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのソマトスタチンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27K】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27L】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのG6PC2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27M】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのPCSK1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

30

【図27N】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのPCSK2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27O】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのSLC30A8の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27P】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

40

【図27Q】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのNKX2.2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27R】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのMNX1(HB9)の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図27S】ステージ5、1日目からステージ6の7日目までの実施例4の分化プロトコルの過程でのUCN3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである

50

【図28A】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのNEUROG3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28B】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのNEUROD1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28C】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28D】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28E】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28F】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのGCGの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28G】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのIAPPの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

。

【図28H】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのMAFBの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

。

【図28I】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

。

【図28J】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのソマトスタチンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28K】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28L】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのG6PC2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28M】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのPCSK1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28N】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのSLC30A8の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28O】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのMNX1(HB9)の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図28P】ステージ5、1日目からステージ6の4日目までの実施例5の分化プロトコルの過程でのUCN3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

。

【図29】NSGマウスの腎臓被膜下に移植された実施例5、ステージ6、1日目の細胞の腹腔内グルコース注射に対するCペプチド反応のグラフである。

【図30A】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロ

10

20

30

40

50

トコルの過程でのA B C C 8の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30B】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのA L Bの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30C】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのA R Xの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30D】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのC D X 2の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

10

【図30E】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンAの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30F】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのクロモグラニンBの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30G】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのG 6 P C 2の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

20

【図30H】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのG C Gの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30I】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのグレリンの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30J】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのI A P Pの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30K】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのインスリンの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

30

【図30L】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのI S L 1の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30M】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのM A F Bの発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30N】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのM N X 1 (H B 9)の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

40

【図30O】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのN E U R O D 1の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30P】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのN E U R O G 3の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

【図30Q】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのN K X 2 . 2の発現に関するリアルタイムq R T - P C Rの結果のグラフである。

50

【図30R】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのNKX6.1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30S】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPAX4の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30T】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPAX6の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30U】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPCSK1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

10

【図30V】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPCSK2の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30W】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPDX1の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30X】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程での膵臓ポリペプチドの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

20

【図30Y】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのPTF1Aの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30Z】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのSLC30A8の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30A-1】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのSSTの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

30

【図30B-1】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのUCN3の発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図30C-1】ステージ3、1日目から分化プロトコルの終わりまでの実施例6の分化プロトコルの過程でのWNT4Aの発現に関するリアルタイムqRT-PCRの結果のグラフである。

【図31】分化のステージ5、7日目でNSGマウスの腎臓被膜下に移植された実施例5の細胞(標準、N=7、及びスキップ4、N=7)の腹腔内グルコース注射に対する平均Cペプチド反応のグラフ(+/-標準偏差)である。

【図32】実施例7のプロトコルに従い分化され、NEUROD1(Y軸)と共染色されるNKX6.1(X軸)について染色された、ステージ5、7日目の細胞のFACSプロファイルのグラフである。

40

【図33】実施例7のプロトコルに従い分化され、NKX6.1(Y軸)と共染色されるPDX1(X軸)について染色された、ステージ5、7日目の細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図34】実施例7のプロトコルに従い分化され、インスリン(Y軸)と共染色されるNKX6.1(X軸)について染色された、ステージ5、7日目の細胞のFACSプロファイルのグラフである。

【図35】NSGマウスの腎臓被膜下に移植された実施例7のステージ5、8日目の細胞について、移植6週間後の腹腔内グルコース注射前後のCペプチド反応のグラフである(

50

N = 7)。

【図36】NSGマウスの腎臓被膜下に移植された実施例7のステージ5、8日目の細胞について、移植12週間後の腹腔内グルコース注射前後のCペプチド反応のグラフである(N = 7)。

【図37A】実施例8のスピナーフラスコ内の培地のpHプロファイルのグラフである。

【図37B】実施例8のスピナーフラスコ内の培地のpHプロファイルのグラフである。

【図38】実施例8の細胞の乳酸産生のグラフである。

【図39】実施例8の細胞のライブ/デッド蛍光撮像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0016】

10

本発明は、凝集細胞集団において、内分泌前駆細胞及び膵内分泌細胞への分化のための多能性を維持する、胚性幹細胞及び他の多能性細胞の調製を目的とする。特にPDX1及びPDX1/NKX6.1共発現細胞が産生される分化ステージの間に、pH、細胞濃度、及びレチノイド濃度のうちの1つ又は2つ以上を制御することによって、ほぼ均質な集団、つまり細胞集団の80%、好ましくは、90%のPDX1/NKX6.1共発現細胞を、早期のNGN3発現を抑制し、NKX6.1発現を促進することにより生成することができることが発明の発見である。PDX1/NKX6.1共発現細胞のほぼ均質な集団を生体外で更に分化させると、その集団は、成熟してPDX1、NKX6.1、インスリン、及びMAFAを共発現する膵内分泌細胞の集団を形成する。

【0017】

20

分化の1つ又は2つ以上のステージの間に、pH7.4の恒常性レベルを下回るpH~約7.2以下のレベル、好ましくは、約7.2~約7.0、より好ましくは、約7.0を使用すると、更に約1,500,000細胞/mL以上~約3,000,000細胞/mL、好ましくは、約1,800,000細胞/mL~約3,000,000細胞/mL、より好ましくは、約2,000,000細胞/mL~約3,000,000細胞/mLの細胞密度も使用すると、TGF- β 又はBMPのシグナル伝達を阻害する、ブロックする、活性化する、又は刺激する成分の追加、かつソニックヘッジホッグ阻害剤の使用の必要性を省略し得ることは、発明の更なる発見である。

【0018】

30

発明の方法では、前腸内胚葉細胞は、PTF1A又はNGN3の発現のない膵内胚葉細胞に分化され得る。低pH、つまり約7.2以下~約7.0の使用は、NGN3の発現をブロックすると考えられる。PTF1A又はNGN3陰性細胞は、後続のステージにおいて、高濃度のPDX1及びNKX6.1(96%以上陽性)を有し、かついくつかのPTF1Aを発現するが、NGN3発現がないままである膵内胚葉細胞集団に更に富化させることができる。細胞は、PTF1A又はNGN3の発現のない膵内胚葉のステージからそのまま、高いNGN3の発現により膵内分泌前駆細胞がステージの終わりまでに膵内分泌細胞へ転換するステージに直接変化され得る。更に、PTF1A又はNGN3細胞の発現のない膵内胚葉細胞が、膵内分泌細胞が形成されるこのステージに変化するとすぐに、細胞は、(PCRによって)MAFAの発現を示し始め、この発現は、ステージの終わりまでにタンパク質として検出可能である。

40

【0019】

発明において有用な幹細胞は、単一細胞レベルでの自己再生能及び分化能の両方によって定義される未分化細胞である。幹細胞は、自己再生前駆細胞、非再生性前駆細胞、及び最終分化細胞を含む子孫細胞を生成することができる。幹細胞はまた、複数の胚葉(内胚葉、中胚葉、及び外胚葉)から様々細胞系統の機能的細胞へと生体外で分化する能力を特徴とする。幹細胞はまた、移植後に複数の胚葉の組織を生じさせ、胚盤胞に注入後、実質的に(全てではないとしても)ほとんどの組織に寄与する。

【0020】

幹細胞は、それらの発生上の潜在性によって分類される。「細胞培養」又は「培養」とは、全般的には、生体から取得され、制御条件下で増殖される(「培養下の」又は「培養

50

される」)細胞を指す。「初代細胞培養」は、最初の継代培養の前に、生物から直接取得された細胞、組織、又は器官の培養である。細胞は、細胞成長及び細胞分裂のいずれか又は両方を促進する条件下で成長培地内に定置される場合に、培養下で増殖して、より大きな細胞の集団を生じさせる。細胞を培養下で増殖させる場合、細胞増殖の速度は、その細胞の数が倍加するために必要な時間量によって測定される場合がある(「倍加時間」と称する)。

【0021】

「増殖」は、本明細書で使用される場合、培養によって多能性幹細胞の数を、少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、75%、90%、100%、200%、500%、1000%以上など、及びこれらのパーセンテージ以内のレベルの分、増加させるプロセスである。単一の多能性幹細胞から得ることのできる多能性幹細胞の数は、多能性幹細胞の増殖能力に依存することが理解される。多能性幹細胞の増殖能力は、細胞の倍加時間、すなわち、細胞が培養下有糸分裂を受けるために必要とされる時間、及び多能性幹細胞が未分化の状態で維持され得る期間(継代数に、それぞれの継代間の日数を掛けた数に等しい)によって計算される。

10

【0022】

分化は、特殊化されていない(「未拘束の」)又は比較的特殊化されていない細胞が、神経細胞又は筋細胞などの特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスである。分化細胞又は分化誘導された細胞とは、細胞の系統内でより特化した(「拘束された」)位置にある細胞である。分化プロセスに適用された際の用語「拘束された」は、通常的环境下で特定の細胞型又は細胞型の小集合への分化を続け、かつ通常的环境下で異なる細胞型に分化したり、又は低分化細胞型に戻ったりすることができない地点まで、分化経路において進行した細胞を指す。「脱分化」は、細胞が細胞の系統内で比較的特殊化されて(又は拘束されて)いない状況に戻るプロセスを指す。本明細書で使用する時、細胞の系統は、その細胞の遺伝性、すなわち、その細胞がどの細胞に由来するか、またその細胞がどのような細胞を生じさせ得るかを規定する。細胞の系統は、発達及び分化の遺伝スキームの範囲内で、その細胞を位置付けるものである。系統特異的マーカーとは、対象とする系統の細胞の表現型と特異的に関連した特徴を指し、拘束されていない細胞の、対象とする系統への分化を評価するために使用することができる。

20

30

【0023】

本明細書で使用する時「マーカー」とは、対象とする細胞で差別的に発現される核酸又はポリペプチド分子である。これに関して、差別的発現とは、未分化細胞と比べて、陽性マーカーについては増殖したレベルを意味し、陰性マーカーについては減少したレベルを意味する。マーカー核酸又はポリペプチドの検出限界は、他の細胞と比較して対象とする細胞において十分に高いか又は低いことから、当該技術分野において知られる各種方法のいずれを用いても対象とする細胞を他の細胞から識別及び区別することが可能である。

【0024】

本明細書で使用する時、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されたとき、特異的マーカー「について陽性」又は「陽性」である。同様に、細胞は、特異的マーカーが細胞内で十分に検出されないとき、特異的マーカー「について陰性」又は「陰性」である。とりわけ、FACSによる陽性は通常2%を超えるが、FACSによる陰性閾値は通常1%を下回る。Open Array(登録商標)PCRシステムを使用した、PCRによる陽性は通常30周期(Cts)を下回り、陰性は通常30周期以上である。TaqMan(登録商標)PCRアッセイを使用した、PCRによる陽性は通常34周期(Cts)を下回り、PCRによる陰性は通常34.5周期を超える。

40

【0025】

本明細書で使用する時、「細胞密度」及び「播種密度」は、互換的に使用され、固体又は半固体平面又は湾曲基質の単位面積あたりに播種された細胞の数を指す。

【0026】

50

「細胞濃度」は、所与の体積単位当たりの細胞の数を指すのに使用される。

【0027】

本明細書で使用するとき、「懸濁培養」は、表面に接着するよりもむしろ、培地内で懸濁された細胞、単一細胞、集団、又は単一細胞及び集団の混合物の培養を指す。

【0028】

本明細書で使用するとき、「無血清」は、ヒト又は動物血清を欠くことを指す。したがって、無血清培養培地は、血清又は血清の部分を含まない。

【0029】

細胞培養での多能性幹細胞の機能的膵内分泌細胞への分化を複製する試みにおいて、分化プロセスは、しばしばいくつかの連続したステージを通して進行していると見なされる。本明細書で使用するとき、様々なステージは、培養時間、及び本明細書に含まれる実施例において説明される試薬によって定義される。

10

【0030】

本明細書で使用するとき、「胚体内胚葉」は、原腸形成中、胚盤葉上層から生じ、胃腸管及びその誘導体を形成する細胞の特徴を保持する細胞を指す。胚体内胚葉細胞は、以下のマーカーの少なくとも1つを発現する。FOXA2（肝細胞核因子3 - （HNF3）としても知られる）、GATA4、GATA6、MNX1、SOX17、CXCR4、ケルペロス、OTX2、短尾奇形、グースコイド、C-Kit、CD99、及びMIXL1。胚体内胚葉細胞に特徴的なマーカーには、CXCR4、FOXA2、及びSOX17が挙げられる。したがって、胚体内胚葉細胞は、CXCR4、FOXA2、及びSOX17の発現で特徴付けられ得る。加えて、細胞を分化の第1のステージに留めさせる時間の長さに応じて、HNF4における増加が観察され得る。

20

【0031】

「前腸内胚葉細胞」は、本明細書で使用するとき、食道、肺、胃、肝臓、膵臓、膀胱、及び十二指腸の一部分を生じる内胚葉細胞を指す。前腸内胚葉細胞は、以下のマーカー、すなわち、PDX1、FOXA2、CDX2、SOX2、及びHNF4のうちの少なくとも1つを発現する。前腸内胚葉細胞は、腸管細胞と比較してPDX1の発現の増加で特徴付けられ得る。

【0032】

「膵前腸前駆細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカー、すなわち、PDX1、NKX6.1、HNF6、NGN3、SOX9、PAX4、PAX6、ISL1、ガストリン、FOXA2、PTF1A、PROX1、及びHNF4のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵前腸前駆細胞は、PDX1、NKX6.1、及びSOX9の発現について陽性であることで特徴付けられ得る。

30

【0033】

「膵内胚葉細胞」は、本明細書で使用するとき、以下のマーカー、すなわち、PDX1、NKX6.1、HNF1、PTF1A、HNF6、HNF4、SOX9、NGN3；ガストリン；HB9、又はPROX1のうちの少なくとも1つを発現する細胞を指す。膵内胚葉細胞は、CDX2又はSOX2の実質的発現の欠失で特徴付けられ得る。

【0034】

「膵内分泌前駆細胞」は、本明細書で使用するとき、膵ホルモン発現細胞になることが可能な膵内胚葉細胞を指す。膵内分泌前駆細胞は、以下のマーカー、すなわち、NGN3、NKX2.2、NeuroD1、ISL1、PAX4、PAX6、又はARXのうちの少なくとも1つを発現する。膵内分泌前駆細胞は、NKX2.2及びNEUROD1の発現で特徴付けられ得る。

40

【0035】

本明細書で使用するとき、「膵内分泌細胞」とは、以下のホルモンのうちの少なくとも1つを発現することが可能な細胞を指す。インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、グレリン、及び膵臓ポリペプチド。これらのホルモンに加え、膵内分泌細胞に特徴的なマーカーは、NGN3、NeuroD1、ISL1、PDX1、NKX6.1、PAX4、A

50

R X、NK X 2 . 2、及び P A X 6 のうちの1つ又は2つ以上を含む。細胞に特徴的なマーカーを発現する膵内分泌細胞は、インスリン及び以下の転写因子の少なくとも1つによって特徴付けられ得る。P D X 1、NK X 2 . 2、NK X 6 . 1、NEUROD 1、I S L 1、H N F 3、M A F A、P A X 4、及び P A X 6。

【0036】

「レチノイド」によってレチノイン酸又はレチノイン酸受容体アゴニストである化合物が意味される。

【0037】

本明細書では、「d 1」、「d 1」、「及び「1日目」、「d 2」、「d 2」、及び「2日目」、「d 3」、「d 3」、及び「3日目」などが互換的に使用される。これらの数字の組み合わせは、本願の段階的分化プロトコル中の異なるステージにおけるインキュベーションの特定の日を指す。

10

【0038】

「グルコース」及び「D - グルコース」は、本明細書で互換的に使用され、天然に一般に見出される糖、デキストロースを指す。

【0039】

多能性幹細胞は、指定された T R A - 1 - 6 0 及び T R A - 1 - 8 1 抗体の1つ又は2つ以上を発現し得る (Thomson et al., 1998, Science 282: 1145 ~ 1147)。生体外での多能性幹細胞の分化は、T R A - 1 - 6 0、及び T R A - 1 - 8 1 の発現の喪失をもたらす。未分化の多能性幹細胞は、典型的には、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、製造業者 (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) によって記載されるように V e c t o r (登録商標) R e d を基質として現像することによって検出することができる、アルカリホスファターゼ活性を有する。未分化の多能性幹細胞はまた、R T - P C R により検出されるように、一般に O C T 4 及び T E R T も発現する。

20

【0040】

増殖させた多能性幹細胞の別の望ましい表現型は、内胚葉、中胚葉、及び外胚葉組織の3胚葉の全ての細胞に分化する能力である。幹細胞の多能性は、例えば、細胞を重症複合免疫不全症 (「S C I D」) マウスに注入し、形成される奇形腫を4%パラホルムアルデヒドで固定し、次いでこれらの3胚葉由来の細胞型の根拠について組織学的に調べることによって確認することができる。代替的に、多能性は、胚様体を形成し、この胚様体を3つの胚葉層に関連したマーカーの存在に対して評価することにより決定することができる。

30

【0041】

増殖させた多能性幹細胞株は、標準的なGバンド法を使用して核型を決定し、次いで確立された、対応する霊長類種の核型と比較することができる。細胞は「正常な核型」を有する細胞を獲得することが望ましく、「正常な核型」とは、細胞が正倍数体であり、ヒト染色体が全て揃っておりかつ目立った変化のないことを意味する。多能性細胞は、様々なフィーダー層を用いて、又はマトリックスたんぱく質被覆した容器を用いて、容易に培養で増殖させることができる。あるいは、m T e S R (登録商標) 1 培地 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s , V a n c o u v e r , B C , C a n a d a) のような明確な培地との組み合わせで、化学的に明確な表面を、細胞の常用増殖のために使用してよい。

40

【0042】

本発明のいくつかの実施形態の方法に従った懸濁培養下での培養は、細胞の生存及び増殖を促進するが分化を制限する細胞濃度で、培養容器内に多能性幹細胞を播種することによって達成される。典型的には、多能性で、未分化の状態に細胞を維持するのに十分な播種密度が使用される。幹細胞の単一細胞懸濁液も播種され得るが、細胞の小さな集団が有利であり得ることが理解されよう。

【0043】

50

懸濁培養下にある間、栄養素及び成長因子の十分かつ一定の供給を多能性幹細胞に提供するために、培養培地は、毎日、又は1～5日毎といった所定のスケジュールで交換又は補充され得る。多能性幹細胞の大きな集団は、細胞分化を引き起こし得るため、大きな多能性幹細胞凝集体を回避するための手段が取られ得る。本発明のいくつかの実施形態に従って、形成された多能性幹細胞集団は、例えば、2～7日毎に分離され、単一細胞又は細胞の小さな塊は追加の培養容器内に分割される（すなわち、継代される）か、又は同一の培養容器内に保持され、交換又は追加の培養培地で処理される。

【0044】

遠心分離から生じる多能性幹細胞のペレットを含む、大きな多能性幹細胞の塊は、酵素消化及び機械的分離のいずれか又は両方を受け得る。多能性幹細胞の塊の酵素消化は、I V型コラゲナーゼ、Dispass（登録商標）、又はAccutase（登録商標）などの酵素に塊をさらすことによって実行され得る。大きな多能性幹細胞の塊の機械的分離は、塊を所定のサイズに破断するように設計されたデバイスを使用して実行され得る。加えて、又は別の方法として、機械的分離は、針又はピペットを使用して手動で実行され得る。

10

【0045】

本発明のいくつかの実施形態の方法に従った、懸濁において多能性幹細胞を培養するために使用される培養容器は、その中で培養される多能性幹細胞が、そのような表面に接着又は結合することができないように設計された内部表面を有する任意の組織培養容器（例えば、多能性幹細胞を培養するために好適な純度等級を有するもの）であり得る（例えば、表面への結合又は接着を防ぐために非組織培養処理した容器）。好ましくは、計測可能な培養を得るために、本発明のいくつかの実施形態に従った培養は、温度、攪拌、pH、及び酸素などの培養パラメーターが、好適なデバイスを使用して自動的に監視及び制御される、制御下の培養系（好ましくは、コンピュータで制御される培養系）を使用して達成される。所望の培養パラメーターが決定されると、系は、多能性幹細胞の増殖及び分化を増すために必要とされる培養パラメーターの自動調整のために設定され得る。

20

【0046】

多能性幹細胞は、複数の継代に渡ってそれらの増殖性、多能性能力、及び核型安定性を維持しながら、動的条件下（すなわち、多能性幹細胞が懸濁培養内にある間、一定の運動（を受ける条件下（例えば、攪拌懸濁培養系））、又は非動的条件下（すなわち、静的培養）で培養され得る。

30

【0047】

多能性幹細胞の非動的培養について、多能性幹細胞は、コーティングされた又はされていない、ペトリ皿、Tフラスコ、HyperFlask（登録商標）（Corning Incorporated, Corning, NY）、CellStacks（登録商標）（Corning Incorporated, Corning, NY）、又はCell Factories（NUNC（商標）Cell Factory（商標）Systems（Termo Fisher Scientific, Inc., Pittsburgh, PA））内で培養され得る。多能性幹細胞の動的培養について、多能性幹細胞は、スピナーフラスコ又は三角フラスコ、ステンレス鋼、ガラス又は単一使用プラスチック振とう器又は攪拌槽などの好適な容器内で培養され得る。培養容器は、制御ユニットに接続され、それにより制御された培養系を提供し得る。培養容器（例えば、スピナーフラスコ又は三角フラスコ）は、連続的又は断続的に攪拌され得る。好ましくは、培養容器は、多能性幹細胞を懸濁状態に維持するために十分に攪拌される。

40

【0048】

多能性幹細胞は、成長及び増殖を促進するために十分な栄養素及び環境的刺激を提供する、任意の培地内で培養され得る。好適な培地には、E8（商標）、IH3、及びmTESR（登録商標）1、又はTESR（登録商標）2が挙げられる。培地は、栄養素供給を補充し、細胞の副産物を除去するために、定期的に変更され得る。本発明のいくつかの実施形態に従って、培養培地は毎日変更される。

50

【0049】

本発明の方法では、任意の多能性幹細胞が使用され得る。使用が可能な多能性幹細胞の例示の種類としては、妊娠期間中の任意の時期（必ずしもではないが、通常は妊娠約10～12週よりも前）に採取した前胚性組織（例えば、胚盤胞など）、胚性組織又は胎児組織などの、妊娠後に形成される組織に由来する多能性細胞の樹立株が含まれる。非限定的な例は、ヒト胚性幹細胞（「hESCs」）又はヒト胚生殖細胞の樹立株であり、例えば、ヒト胚性幹細胞株H1、H7、及びH9（WiCell Research Institute, Madison, WI, USA）などである。フィーダー細胞の非存在下で既に培養された多能性幹細胞集団から採取した細胞も好適である。

【0050】

また、OCT4、NANOG、SOX2、KLF4、及びZFP42など多数の多能性に関する転写因子の強制発現を用いて、成体体細胞から誘導することができる誘導性多能性細胞（「iPS」）又は再プログラム化された多能性細胞も好適である（Annu Rev Genomics Hum Genet 2011, 12:165～185）。本発明の方法で使用されるヒト胚性幹細胞もまた、Thomsonらによって記載されるように調製され得る（米国特許第5,843,780号、Science, 1998, 282:1145～1147; Curr Top Dev Biol 1998, 38:133～165; Proc Natl Acad Sci U.S.A. 1995, 92:7844～7848）。また、例えば、BG01v（BresaGen, Athens, Ga.）などの変異体ヒト胚性幹細胞株、又は例えば、Takahashi et al., Cell 131:1～12（2007）に開示されている細胞などの成人ヒト体性細胞に由来する細胞も好適である。本発明での使用に好適な多能性幹細胞は、Liet al., Cell Stem Cell 4:16～19, 2009; Maherali et al., Cell Stem Cell 1:55～70, 2007; Stadtfeld et al., Cell Stem Cell 2:230～240; Nakagawa et al., Nature Biotechnology 26:101～106, 2008; Takahashi et al., Cell 131:861～872, 2007; 及び米国特許出願公開第2011-0104805号に記載された方法に従って誘導され得る。多能性幹細胞の他の供給源は、誘導された多能性細胞（iPS, Cell, 126(4):663～676）を含む。本発明の方法における使用のために好適な細胞の他の供給源には、ヒト臍帯組織由来細胞、ヒト羊水由来細胞、ヒト胎盤由来細胞、及びヒト単為生殖生物が挙げられる。一実施形態において、臍帯組織由来細胞は米国特許第7,510,873号の方法を使用して得られ得、その開示は、それが細胞の隔離及び特性評価に関連するために、参照によりその全体が組み込まれる。別の実施形態において、胎盤組織由来細胞は、米国出願公開第2005/0058631号の方法を使用して得られ得、その開示は、それが細胞の隔離及び特性評価に関連するために、参照によりその全体が組み込まれる。別の実施形態において、羊水由来細胞は、米国出願公開第2007/0122903号の方法を使用して得られ得、それが細胞の隔離及び特性評価に関連するために、参照によりその全体が組み込まれる。

【0051】

多能性幹細胞の特性は当業者には周知であり、多能性幹細胞の更なる特性が引き続き同定されている。多能性幹細胞マーカーとして、例えば、以下のうちの1つ又は2つ以上（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、又は全て）の発現が挙げられる。ABCG2、cripto、FOXD3、CONNEXIN43、CONNEXIN45、OCT4、SOX2、NANOG、hTERT、UTF1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81。一実施形態において、本発明の方法での使用に好適な多能性幹細胞は、フローサイトメトリーによって検出される、CD9、SSEA4、TRA-1-60、及びTRA-1-81のうちの1つ又は2つ以上（例えば、1、2、3、又は全て）を発現し、分化のマーカーCXCR4（CD184としても知られる）の発現を欠く。別の実施形態において、本発明

10

20

30

40

50

の方法における使用のために好適な多能性幹細胞は、RT-PCRによって検出される、CD9、NANOG、及びPOU5F1/OCT4のうちの1つ又は2つ以上（例えば、1、2、又は全て）を発現する。

【0052】

例示的な多能性幹細胞として、ヒト胚性幹細胞株H9（NIHコード：WA09）、ヒト胚性幹細胞株H1（NIHコード：WA01）、ヒト胚性幹細胞株H7（NIHコード：WA07）、及びヒト胚性幹細胞株SA002（Cellartis, Sweden）が挙げられる。一実施形態では、多能性幹細胞はヒト胚性幹細胞、例えば、H1 hES細胞である。代替の実施形態において、非胚性起源の多能性幹細胞が使用され得る。

【0053】

本発明は、以下に記載される実施形態のいくつかにおいて、幹細胞の隔離及び培養、特に動的懸濁培養系において多能性を保持する幹細胞集団の培養に関する。多能性細胞集団は、機能的細胞を産生するように分化され得る。

【0054】

本発明の方法で使用される多能性幹細胞は、好ましくは、所望の終点に向けた分化の前に、動的懸濁培養下で増殖される。有利なことに、多能性幹細胞は、多能性を損失することなく、好適な培地内に懸濁状態で細胞の集団として培養され、増殖されることが発見されている。そのような培養は、多能性の損失を防ぐために、細胞又は細胞集団が十分に移植させられ続ける、動的懸濁培養系内で生じ得る。有用な動的懸濁培養系は、攪拌、振とう、再循環、又は培地を通したガスのバブリングなどを介して、培養内容物を攪拌するための手段を備えた系を含む。そのような攪拌は、増殖を促進し、早期分化を防ぐための細胞集団の十分な運動が維持される限り、断続的又は連続的であってよい。好ましくは、攪拌は、特定の速度で回転する羽根車などを介する連続的攪拌を含む。羽根車は、円形又は平坦な底部を有してよい。羽根車の攪拌速度は、集団が懸濁状態に維持され、沈降が最小化されるようなものであるべきである。更に、羽根車ブレードの角度は、沈降を回避するための細胞及び集団の上方運動を補助するために、調整され得る。また、羽根車の型、角度、及び回転速度は全て、細胞及び集団が均一なコロイド懸濁液のようなものにあるように調整され得る。

【0055】

多能性幹細胞集団の懸濁培養及び増殖は、使い捨て可能なプラスチック、再利用可能なプラスチック、ステンレス鋼又はガラス容器、例えば、スピナーフラスコ又は三角フラスコなどの適した動的培養系に、静的培養した幹細胞を移植することによって達成され得る。例えば、接着性静的環境、すなわち、プレート又は皿表面で培養した幹細胞は、まずキレート剤又は酵素で処理することによって表面から除去され得る。好適な酵素として、限定するものではないが、I型コラゲナーゼ、Dispase（登録商標）（Sigma Aldrich LLC, St. Louis, MO）、又はAccutase（登録商標）（Sigma Aldrich LLC, St. Louis, MO）の商標名で販売される商業的に入手可能な製剤が挙げられる。Accutase（登録商標）は、コラーゲン分解性又はたんぱく分解酵素（甲殻類から隔離される）を含み、哺乳類又は細菌由来の産物を含む細胞剥離液である。したがって、一実施形態において、酵素は、コラーゲン分解酵素若しくはたんぱく分解酵素、又はコラーゲン分解及びたんぱく質分解酵素を含む細胞剥離液である。好適なキレート剤としては、限定するものではないが、エチレンジアミン四酢酸（「EDTA」）が挙げられる。いくつかの実施形態において、多能性幹細胞培養は、好ましくは、群体の縁部が丸まって持ち上がり始めるまで、ただし培養表面からの群体の完全な剥離の前に、酵素又はキレート剤と共にインキュベートされる。一実施形態において、細胞培養は室温でインキュベートされる。一実施形態では、細胞は、20 超、25 超、30 超又は35 超の温度で、例えば、約20 ~ 約40、約25 ~ 約40、約30 ~ 約40 の温度、例えば約37 でインキュベートされる。一実施形態では、細胞は、少なくとも約1、少なくとも約5、少なくとも約10、少なくとも約15、少なくとも約20分間、例えば、約1 ~ 約30分間、約5 ~ 約30分間

10

20

30

40

50

、約10～約25分間、約15～約25分間、例えば約20分間インキュベートされる。一実施形態において、この方法は、処理の後に細胞培養から酵素又はキレート剤を除去する工程を含む。一実施形態において、細胞培養は、酵素又はキレート剤の除去の後、1度又は2度以上洗浄される。一実施形態において、細胞培養は、mTeSR(登録商標)1(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada)などの適切な培養培地で洗浄される。一実施形態において、Rhoキナーゼ阻害剤(例えば、Y-27632, AxXoraカタログ番号ALX-270-333, San Diego, CA)。Rhoキナーゼ阻害剤は、約1～約100 μ M、約1～90 μ M、約1～約80 μ M、約1～約70 μ M、約1～約60 μ M、約1～約50 μ M、約1～約40 μ M、約1～約30 μ M、約1～約20 μ M、約1～約15 μ M、約1～約10 μ M、又は約10 μ Mの濃度であってよい。一実施形態において、Rhoキナーゼ阻害剤は、少なくとも1 μ M、少なくとも5 μ M、又は少なくとも10 μ M添加される。細胞は、スクレーパ又はゴム製ポリスマンで静的培養系の表面から剥離され得る。培地及び細胞は、ガラスピペット又は他の好適な手段を使用して動的培養系に移植され得る。好ましい実施形態において、動的培養系内の培地は、毎日変更される。

10

【0056】

本発明は、一実施形態において、三次元の懸濁培養内で多能性幹細胞を培養し、増殖させる方法を提供する。とりわけ、この方法は、これらの多能性幹細胞の凝集細胞集団を形成することによって、多能性幹細胞の培養及び増殖をもたらす。細胞集団は、細胞を培養する前に、酵素(例えば、Dispase(登録商標)などの中性プロテアーゼ)又はキレート剤で多能性幹細胞培養を処理した結果として形成し得る。細胞は、好ましくは、攪拌又は振とうされる懸濁培養系内で培養され得る。一実施形態において、本発明は、多能性幹細胞のそのような集団から、臍臓内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現する細胞の形成を更に提供する。

20

【0057】

好ましくは、細胞集団は、凝集多能性幹細胞である。凝集幹細胞は、多能性の1つ又は2つ以上のマーカー、例えば、マーカーCD9、SSEA4、TRA-1-60、及びTRA-1-81のうちの1つ以上(例えば、1、2、3、又は全て)を発現し、分化に関する1つ又は2つ以上のマーカーの発現を欠く(例えば、CXCR4の発現を欠く)。一実施形態において、凝集幹細胞は、多能性のマーカーCD9、SSEA4、TRA-1-60、及びTRA-1-81を発現し、分化に関するマーカーCXCR4の発現を欠く。

30

【0058】

一実施形態は、懸濁培養内で多能性幹細胞を細胞集団として培養する方法である。細胞集団は、動的攪拌又は振とうされる懸濁培養系において培養された、凝集多能性幹細胞である。細胞集団は、中性プロテアーゼ、例えば、Dispaseなどの酵素を細胞の剥離剤として使用して、平面接着培養から攪拌又は振とうされる懸濁培養系へ移植され得る。例示的な好適な酵素としては、限定されるものではないが、IV型コラゲナーゼ、Dispase(登録商標)、又はAccutase(登録商標)が挙げられる。細胞は、攪拌又は振とうされる懸濁培養系において、特に攪拌される懸濁培養系において、多能性を維持する。

40

【0059】

本発明の別の実施形態は、懸濁培養内で多能性幹細胞を細胞集団として培養する方法であって、細胞集団は、キレート剤、例えば、EDTAを使用して平面接着培養から移植され、攪拌又は振とうされる懸濁培養系内で培養される、凝集多能性幹細胞である。細胞集団は、攪拌又は振とうされる懸濁培養系、特に攪拌される(動的に攪拌される)懸濁培養系で多能性を維持する。

【0060】

本発明の別の実施形態は、懸濁培養内で多能性幹細胞を細胞集団として培養する方法であって、細胞集団は、酵素Accutase(登録商標)を使用して平面接着培養から移植され、攪拌又は振とうされる懸濁培養系内で培養される、凝集多能性幹細胞である。細

50

胞集団は、動的に攪拌される懸濁培養系で多能性を維持する。

【0061】

本発明の細胞集団は、心性細胞などの中胚葉細胞、神経細胞などの外胚葉細胞、単一ホルモン陽性細胞、又は膵臓内胚葉細胞に分化し得る。この方法は、分化、例えば、膵臓内胚葉細胞の膵臓前駆細胞及び膵臓ホルモン発現細胞への分化を更に含み得る。別の実施形態において、膵臓前駆細胞は、細胞転写因子PDX1及びNKX6.1の発現によって特性化される。

【0062】

一実施形態において、分化の工程は、懸濁培養系において少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも36時間、少なくとも48時間、少なくとも72時間、少なくとも96時間、少なくとも120時間、少なくとも144時間、少なくとも168時間、少なくとも196時間以上、好ましくは約48時間～約72時間後に実行される。分化は、実施例又は下の表Aに記載されるもののような、培地成分のステージ式の進行を使用して実行され得る。

10

【0063】

一実施形態において、三次元の細胞集団は、平面接着培養下で多能性幹細胞を成長させることと、多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させることと、酵素又はキレート剤を使用して、多能性幹細胞の集団を平面接着培養から動的懸濁培養へ移植することと、によって産生される。更なる実施形態は、平面接着培養下で多能性幹細胞を成長させることと、多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させることと、酵素又はキレート剤を使用して、多能性幹細胞の集団を平面接着培養から動的懸濁培養へ移植することと、動的攪拌される懸濁培養系内で多能性細胞集団を分化させて、膵臓前駆細胞集団を生成することと、によって、動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖及び分化させる方法である。

20

【0064】

別の実施形態は、膵臓前駆細胞へと分化された、増殖した多能性幹細胞集団の懸濁から調製された、分化した幹細胞を含む、移植可能な幹細胞由来の細胞産物である。より具体的には、移植可能な幹細胞由来の産物は、平面接着培養下で多能性幹細胞を成長させることと、多能性幹細胞を凝集細胞集団に増殖させることと、酵素又はキレート剤を使用して、多能性幹細胞の集団を平面接着培養から動的懸濁培養へ移植することと、動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性細胞集団を分化させることと、によって産生される。移植可能な幹細胞由来の細胞産物は、好ましくは、糖尿病を治療するために使用される。

30

【0065】

別の実施形態において、この方法は、機能的膵内分泌細胞への更なる生体内での成熟のための、糖尿病の動物内への移植を含む。

【0066】

別の実施形態は、平面接着培養下で多能性幹細胞を成長させることと、酵素を使用して平面接着培養から多能性幹細胞を取り外すことと、静的培養下で多能性幹細胞をマイクロキャリアに接着させることと、動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性細胞を増殖させることと、動的に攪拌される懸濁培養系内で多能性細胞を分化させて、膵臓前駆細胞集団を生成することと、を含む、懸濁培養系内で多能性幹細胞を増殖及び分化させる方法である。

40

【0067】

マイクロキャリアは、接着細胞について当該技術分野において既知の任意の形態であり得、とりわけ、マイクロキャリアはビーズであり得る。マイクロキャリアは、天然又は合成的に由来する材料からなり得る。例としては、コラーゲンベースのマイクロキャリア、デキストランベースのマイクロキャリア、又はセルロースベースのマイクロキャリアが挙げられる。例えば、マイクロキャリアビーズは、表面に結合して、マイクロキャリアに対して正に帯電している表面を提供するカチオントリメチルアンモニウムを有する、改質ポリスチレンビーズであり得る。ビーズ直径は、約90～約200 μm 、あるいは約100～約190 μm 、あるいは約110～約180 μm 、あるいは約125～175 μm の範

50

囲であり得る。マイクロキャリアビーズはまた、架橋デキストランのマトリックスに化学的に連結した変性コラーゲンの薄層であり得る。マイクロキャリアビーズは、ガラス、セラミックス、ポリマー（ポリスチレンなど）、又は金属であり得る。更に、マイクロキャリアは、シリコン、又はコラーゲンなどのたんぱく質などでコーティングされても、又はコーティングされなくてもよい。更なる態様では、マイクロキャリアは、マイクロキャリアへの細胞の結合性を高める、及びマイクロキャリアからの細胞の放出を高める化合物（限定するものではないが、ヒアルロン酸ナトリウム、ポリ（モノステアロイルグリセリドココハク酸）、ポリ-D, L-ラクチド-コ-グリコリド、フィブロネクチン、ラミニン、エラスチン、リジン、n-イソプロピルアクリルアミド、ピトロネクチン、及びコラーゲンが挙げられる）で構成されるか、又はコーティングされてもよい。実施例は、低レベルの生物学的に関連する電気を発生する、亜鉛及び銅の微粒子ガルバーニ電気連結を有するマイクロキャリア、又は常磁性カルシウムアルギン酸マイクロキャリアなどの常磁性のマイクロキャリアといった、微小電流を有するマイクロキャリアを更に含む。

10

【0068】

いくつかの実施形態において、膵臓内胚葉細胞集団は、多能性細胞集団の段階的分化によって取得される。いくつかの実施形態において、多能性細胞は、ヒト胚性多能性幹細胞である。本発明の一態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、原始線条前駆体細胞である。別の態様において、胚体内胚葉系統に特徴的なマーカーを発現している細胞は、中内胚葉細胞である。

20

【0069】

いくつかの実施形態において、本発明は、動的懸濁培養でステージ3～5の細胞を培養することを含む、多能性細胞を分化させる段階的な方法に関する。いくつかの実施形態において、生成される膵臓内胚葉集団は、機能的膵内分泌細胞への更なる生体内での成熟のために、糖尿病の動物内に移植される。本発明はまた、本発明の方法で使用する系又はキットを提供する。

【0070】

本発明はまた、本発明の方法によって取得可能な細胞、又は細胞の集団を提供する。本発明はまた、本発明の方法によって取得される細胞、又は細胞の集団を提供する。

【0071】

本発明は、治療法を提供する。とりわけ、本発明は糖尿病に罹患しているか、又は糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法を提供する。

30

【0072】

本発明はまた、治療法で使用するために、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞又は細胞の集団を提供する。とりわけ、本発明は、糖尿病に罹患しているか、又は糖尿病を発症するリスクを有する患者を治療する方法で使用する、本発明の方法によって取得可能な、又は得られる、細胞又は細胞の集団を提供する。糖尿病は、1型又は2型糖尿病であり得る。

【0073】

一実施形態において、治療法は、本発明の方法によって得られるか、又は取得可能な細胞を患者に埋め込むことを含む。

40

【0074】

一実施形態において、治療法は、生体外で多能性幹細胞をステージ1、ステージ2、ステージ3、ステージ4、ステージ5、又はステージ6の細胞に分化させることと、例えば、本明細書に記載するように、分化した細胞を患者内に埋め込むこととを含む。

【0075】

一実施形態において、この方法は、例えば、本明細書に記載するように、多能性幹細胞を分化させる工程の前に、多能性幹細胞を培養する工程を更に含む。

【0076】

一実施形態において、この方法は、埋め込みの工程の後に、生体内で細胞を分化させる工程を更に含む。

50

【0077】

一実施形態において、患者は哺乳類、好ましくはヒトである。

【0078】

一実施形態において、細胞は、分散した細胞として埋め込まれてもよく、又は肝門脈内に移植あるいは注入され得る集団として形成されてもよい。あるいは、細胞は、生体適合性の分解性ポリマー支持体、多孔性の非分解性デバイス内に提供されてもよく、又は宿主免疫応答から保護されるよう封入されてもよい。細胞は、レシピエント内の任意の適切な部位内に移植されてもよい。埋め込み部位としては、例えば、肝臓、天然の脾臓、腎被膜下空間、網、腹膜、漿膜下空間、腸、胃、又は皮下ポケットが挙げられる。

【0079】

生体内で埋め込まれた細胞の更なる分化、生存、又は活性を向上するために、増殖因子、抗酸化剤、又は抗炎症剤などの追加の因子を、細胞の投与前に、投与と同時に、又は投与後に投与してもよい。これらの因子は、内在性細胞により分泌され、投与された細胞に原位置で曝露されてもよい。埋め込まれた細胞は、当該技術分野において既知の内因性の成長因子、及び当該技術分野において既知の外因性の成長因子の任意の組み合わせにより、分化を誘導され得る。

【0080】

埋め込みに使用する細胞の量は、患者の状態及び治療に対する応答を含む、多数の様々な要因に基づいて当業者により決定され得る。

【0081】

一実施形態において、治療法は、埋め込み前に、細胞を三次元の支持体内に取り込むことを更に含む。細胞は、患者に埋め込む前に、生体外でこの支持体上に維持されてもよい。あるいは、細胞を含む支持体は、更に生体外で培養することなく、直接患者に埋め込んでもよい。支持体は、場合により、埋め込まれた細胞の生存及び機能を促進する少なくとも1つの医薬品を組み込んでもよい。

【0082】

本発明の特定の実施形態において、表Aに列挙された成分のうち1つ又は2つ以上が本発明の方法で使用され得る。

【0083】

10

20

【表 1】

表 A

成分／条件	好適な量／濃度
ALK5阻害剤II	約500～約30,000nM(30μM)、約600～約20,000nM(20μM)、約700～約10,000nM(10μM)、約800～約1000nM(10μM)、約10μM、約100nM、約500nM又は約1μM、約0.6～約10μM、約0.6～約1μM
アスコルビン酸	約0～約250μM
ベータセルリン	約0～約20ng/mL
CHIR99021	約3～約30μM
FAF-BSA	約2%、0.1%～約2%
FGF7	約50ng/mL、約30ng/mL～約60ng/mL、約25ng/mL～約55ng/mL
γセクレターゼ阻害剤XX	約0～約1,000nM、約30～約300nM、約100nM～約1μM; 約100nM; 約1μM
γセクレターゼ阻害剤XXI	約0～約3,000nM、約100nM～約3000nM、約100nM～約1μM; 約100nM; 約1μM
GDF8	約100ng/mL、約80ng/mL～約150ng/mL、約75ng/mL～約125ng/mL、約75ng/mL～約150ng/mL
血糖値	約1mM～約50mM; 約1mM～約25.5mM、約1mM～約20mM、約1nM～約10nM、約1nM～約10nM、約1nM～約8nM、約1nM～約5nM 約2.5mM～約50mM; 約2.5mM～約25.5mM、約2.5mM～約20mM、約2.5nM～約10nM、約2.5nM～約10nM、約2.5nM～約8nM、約2.5nM～約5nM 約8mM～約50mM; 約8mM～約25.5mM、約8mM～約20mM、約8nM～約10nM、約8nM～約10nM 約10mM～約50mM; 約10mM～約25.5mM、約10mM～約20mM 約20mM～約50mM; 約20mM～約25.5mM、約25.5mM～約50mM 約2.5mM、約5.5mM、約8mM、約10mM、約20mM、約25mM
ITS-X	約1:50,000、約1:200、約1:1000、約1:10,000
LDN-1913189	約0nM～約150nM、約50nM～約150nM
MCX化合物	約3μM、約2μM、約2μM、約0.5μM、約0.5μM～約5μM、約1μM～約4μM、約1μM～約3μM、約2μM～約3μM
レチノイン酸	約2μM、約1μM、約0.5μM、約0.1μM、約0.11μM～約3μM、約0.5μM～約2.5μM
SANT-1	約0、約0.25μM、約0μM～約0.3μM、約0.1～約0.3μM。約0.1μM～約0.25μM
TppB又はTPB	約500nM、約100nM、約50nM～約550nM、約50nM～約150nM、約200nM～約500nM、約300nM～約550nM、約50nM、約25nM～約75nM
Y-27632	約10μM、約5μM～約15μM、約5μM～約10μM

10

20

30

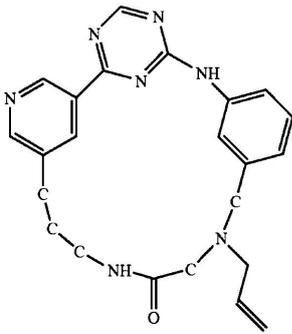
40

【0084】

本明細書で使用するとおり、「MCX化合物」は、14-プロパ-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6-~.1~8,12.~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,21,23-ノナエン-16-オンであり、以下の式(式1)を有する。

【0085】

【化 1】



10

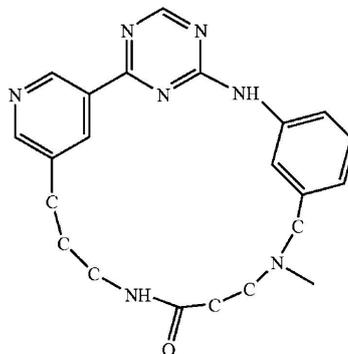
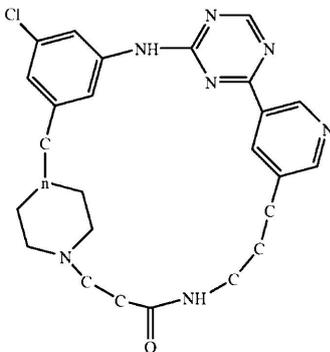
【0086】

上記のMCX化合物の代わりに、他の環式アニリンピリジノトリアジンもまた使用され得る。かかる化合物としては、限定されるものではないが、14-メチル-3,5,7,14,18,24,28-ヘプタアザテトラシクロ[20.3.1.1~2,6~-1~8,12~]オクタコサ-1(26),2(28),3,5,8(27),9,11,22,24-ノナエン-17-on-e、及び5-クロロ-1,8,10,12,16,22,26,32-オクタアザペンタシクロ[24.2.2.1~3,7~-1~9,13~-1~14,18~]トリトリアコンタ-3(33),4,6,9(32),10-,12,14(31),15,17-ノナエン-23-オンが挙げられる。これらの配合物を以下に示す(式2及び式3)。

20

【0087】

【化 2】



30

【0088】

例示の好適な化合物は、米国特許出願公開第2010/0015711号に開示され、その開示は、MCX化合物、関連する環式アニリンピリジノトリアジン、及びそれらの合成に関連するため、その全体が組み込まれる。

【0089】

本明細書を通して引用された刊行物は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

40

【0090】

本発明を以下の非限定的な実施例によって更に説明する。

【0091】

(実施例1)

本実施例は、0.5リットルのスピナーフラスコを使用して攪拌される懸濁培養系内でインスリン発現細胞の形成を実証する。培地及び気体を、取り外し可能なサイドアームキャップを通じて交換した。インスリン陽性細胞は、細胞がPDX1を最初に発現し、次に隣細胞の形成及び機能に必要なタンパク質転写因子であるNKX6.1も共発現した段階的なプロセスで形成された。これらの共発現細胞は、次に、懸濁培養内にある間にPDX1及びNKX6.1と組み合わせて、インスリン及びその後MAFAの発現を得た。こ

50

の細胞の集団を、免疫力が低下したマウスの腎臓被膜の中に移植したとき、生着の4週間以内にヒトCペプチドの検出可能血中濃度を産生した。

【0092】

ヒト胚幹細胞株H1 (WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin))の細胞を、動的懸濁液の状態の、脂肪酸フリーウシ血清アルブミン(「FAF-BSA」)(Proliant, Inc. (Boone, Idaho);カタログ番号68700)を0.5重量対体積% (「w/v」)補充したEssential 8 (商標) (「E8 (商標)」)培地 (Life Technologies Incorporated (Carlsbad, California);カタログ番号A15169-01)で、丸い凝集集団として4の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び2~10細胞の集団として凍結した。凝集集団内の約600,000,000~1,000,000,000細胞を、遠心管に移し、100mLの1X Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, without Calcium or Magnesium (「DPS-/-」)(Life Technologies;カタログ番号14190-144)を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットにStemPro (登録商標) Accutase (登録商標) 酵素 (Life Technologies、カタログ番号A11105-01)を50体積%、及びDPBS-/-を50体積%の溶液30mLを添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで1~3度上下させてから、断続的に室温で約4分間回転させ、その後80~200rcfで5分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase (登録商標)の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約4分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び2~10細胞からなる集団にほぐした。4分後、細胞を、10µMのY-27632 (Enzo Life Sciences, Inc. (Farmingdale, NY);カタログ番号ALX-270-333)及び0.5%w/vのFAF-BSAを補充した100mLのE8 (商標)培地に再懸濁させ、80~200rcfで5~12分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mLあたり100,000,000~150,000,000細胞の最終濃度を得るために冷たい(4)Cryostor (登録商標) Cell Preservation Media CS10 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO);カタログ番号C2874-100mL)を滴加した。この細胞溶液を、2mLの極低温バイアル (Corning Incorporated (Corning, NY);カタログ番号430488)に小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレートフリーザー (CryoMed (商標) 34L Controlled-Rate Freezer, Thermo Fischer Scientific, Inc. (Buffalo, NY);カタログ番号7452)を使用して細胞を凍結した。チャンバを4に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が6に達するまで保持し、次に試料が-7に達するまでチャンバの温度を毎分2下げ、その時点でチャンバが-45に達するまでチャンバを20/分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が-25に達するまで10/分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが-40に達するまで0.8/分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが-100に達するまで10/分で冷却し、その時点で、次にチャンバが-160に達するまでチャンバを35/分冷却した。チャンバの温度を、次に-160で少なくとも10分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保管庫に移動した。これらの高濃度で凍結保存した単一細胞を中間/処理中の種材(「ISM」)として次に使用した。

【0093】

ISMのバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター (DASGIP Information and Process Technology GmbH (Juelich, Germany))に播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、37の水浴に12

10

20

30

40

50

0秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、安全キャビネット(「BSC」)に移動させ、解凍された内容物を、2mLガラスピペットを介して50mL円錐管に移した。次に、0.5%w/vのFAF-BSA及び10 μ MのRhoキナーゼ阻害剤Y-27632を補充した10mLのE8(商標)培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80~200rcfで5分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5%w/vのFAF-BSA及び10 μ MのY-27632を補充した10mLの新鮮なE8(商標)培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5%w/vのFAF-BSA及び10 μ MのY-27632を補充した450mLのE8(商標)培地を収容する培地移動ボトル(Cap2V8(登録商標), Sanisure, Inc. (Moorpark, California))内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌C-Flex(登録商標)チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイリアクター内に直接ポンプで注入した。37に予熱し、70rpmで撹拌した、0.5%w/vのFAF-BSA及び10 μ MのY-27632を補充した1000mLのE8(商標)培地で、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)、及び5%の制御されたCO₂分圧によって、バイリアクターを調製した。0.225 \times 10⁶細胞/mL(濃度範囲:0.2~0.5 \times 10⁶細胞/mL)の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

【0094】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、撹拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5%w/vのFAF-BSAを補充した1.5LのE8(商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、細胞をバイリアクターから汲み出し、分化のために3つの0.5L使い捨てスピナーフラスコ(Corning;カタログ番号3153)の中に移した。全てのスピナーフラスコは、5%CO₂を補充した37加湿インキュベータ内で、かつ60RPM(55~65RPM)の一定の撹拌速度で維持された。分化プロトコルは、条件A、B、及びCとして以下に説明される。

【0095】

分化プロセスを通じて、培地交換のためにスピナーをインキュベータ内の動的撹拌からBSCへ移動した。スピナーを撹拌せずに6分間保持して、細胞集団の大多数を容器の底部に沈降させた。6分後、スピナーフラスコのサイドアームキャップを取り外し、使用済み培地の90%以上を吸引によって取り除いた。使用済み培地を取り除くとすぐに、開いているサイドアームを通じてスピナーフラスコに300mLの新鮮培地を足し戻した。スピナーキャップはその後取り換えられ、前述の条件下でインキュベータ内の動的懸濁に戻された。

【0096】

ステージ1(3日間):

条件Aについては、基本培地(「ステージ1基本培地」)を、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム(Sigma Aldrich;カタログ番号S3187)、MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA;1X濃度のGlutaMAX(商標)(Life Technologies;カタログ番号35050-079);2.5mMグルコース(45%水溶液;Sigma Aldrich;カタログ番号G8769);及びインスリン-トランスフェリン-セレニウム-エタノールアミン(「ITS-X」)(Life Technologies;カタログ番号51500056)の1:50,000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB-131培地(Life Technologies;カタログ番号10372-019)を使用して調製した。細胞を、100ng/mLの増殖分化因子8(「GDF8」)(PeproTech, Inc. (Rocky Hill, New Jersey);カタログ番号120-00);及び2 μ Mの14-プロパ-2-エン-1-イル-3,5,7,14,17,23,27-ヘプタアザテトラシクロ[19.3.1.1~2,6~.1~8,12~]ヘプタコサ-1(25),2(27),3,5,8(26),9,11,2

10

20

30

40

50

1, 23 - ノナエン - 16 - オン (「MCX化合物」) を補充した300 mLのステージ1基本培地で1日培養した。24時間後、培地交換を上述のように完了し、100 ng/mLのGDF8を補充した(ただしMCX化合物は補充しない)新鮮な300 mLのステージ1基本培地をフラスコに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。

【0097】

条件Bでは、3 μMのMCX化合物を1日目に使用したことを除き、条件Aについて記載したように細胞を培養した。

【0098】

条件Cでは、GDF8の代わりに100 ng/mLのアクチビンAを使用したこと、及びMCX化合物の代わりに30 μMのグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 阻害剤(6 - [[2 - [[4 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (5 - メチル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) - 2 ピリミジニル] アミノ] エチル] アミノ] - 3 - ピリジンカルボニトリル (pyridinecarbonitrile) (「CHIR99021」) (Stemgent Inc (Cambridge Massachusetts) カタログ番号04004 - 10) を使用したことを除き、条件Aについて記載したように細胞を培養した。

【0099】

ステージ2 (3日間) :

条件Aについては、基本培地(「ステージ2基本培地」)を、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有し、追加の1.2 g/L重炭酸ナトリウム; MCDB - 131に予め再構成された2% w/vのFAF - BSA; 1X濃度のGlutaMAX (商標); 2.5 mMグルコース; 及びITS - Xの1:50, 000希釈物を補充した、MCDB - 131培地を使用して調製した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、50 ng/mLの線維芽細胞増殖因子7 (「FGF7」) (R&D Systems (Minneapolis, Minnesota); カタログ番号251 - KG) を補充した300 mLのステージ2基本培地と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50 ng/mLのFGF7を補充した300 mLの新鮮なステージ2基本培地と置換した。

【0100】

条件Bでは、条件Aのように細胞を培養した。

【0101】

条件Cでは、250 μLの1Mアスコルビン酸 (Sigma Aldrich; 水中に再構成された、カタログ番号A4544) を1Lのステージ2基本培地に更に追加して、条件A及びBのように細胞を培養した。

【0102】

ステージ3 (条件A及びBで3日間、並びに条件Cで2日間) :

条件Aについては、基本培地(「ステージ3~4基本培地」)を、追加の1.2 g/L重炭酸ナトリウム; MCDB - 131に予め再構成された2% w/vのFAF - BSA; 1X濃度のGlutaMAX (商標); 2.5 mMグルコース; 及びITS - Xの1:200希釈物を補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB - 131培地を使用して調製した。ステージ2の完了後、培地交換を完了して、使用済み培地を、50 ng/mLのFGF - 7; 100 nMの骨形成(「BMP」)受容体阻害剤(6 - (4 - (2 - (ピペリジン - 1 - イル)エトキシ)フェニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル)ピラゾロ[1, 5 - a]ピリミジン塩酸塩) (「LDN - 193189」, Shanghai ChemPartner Co Ltd. (Shanghai, China)); 2 μMのレチノイン酸(「RA」) (Sigma Aldrich; カタログ番号R2625); 0.25 μMのN - [(3, 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール (prazol) - 4 - イル)メチレン] - 4 - (フェニルメチル) - 1 - ピペラジニアミン (「SANT - 1」) (Sigma Aldrich; カタログ番号S4572); 及び400 nMのPKC活性剤(2S, 5S - (E, E) - 8 - (5 - (4 - トリフルオロ

10

20

30

40

50

メチル)フェニル - 2 , 4 - ペンタジエノイルアミノ)ベンゾラクタム(「TPB」)(Shanghai ChemPartner Co Ltd.(Shanghai, China))を補充した300mLのステージ3~4基本培地と置換した。培地交換24時間後、使用済み培地を、LDN-193189を除いて、上記添加剤を含む300mLの新鮮なステージ3~4基本培地と再度置換した。その培地で48時間細胞を培養した。

【0103】

条件Bでは、条件Aのように細胞を培養した。

【0104】

条件Cでは、ステージ3~4基本培地に250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸溶液を更に追加して条件A及びBのように細胞を培養した。更に、ステージ3の開始の48時間後、以下に説明したように細胞をステージ4培地に移植した。

【0105】

ステージ4(条件A及びBで3日間、並びに条件Cで4日間) :

条件Aについては、ステージ3の完了後、使用済み培地を取り除き、0.25 μ MのSANT-1及び400nMのTPBを補充した300mLのステージ3~4基本培地と置換した。ステージ4の開始の48時間後、3.2mL/Lの45%グルコース溶液(8mMグルコースポラス)をフラスコに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。

【0106】

条件Bでは、条件Aのように細胞を培養した。

【0107】

条件Cでは、ステージ3~4基本培地に0.1 μ MのRA、50ng/mLのFGF7、及び250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸溶液を更に補充したことを除いて、条件A及びBのように細胞を培養した。48時間後、使用済み培地を同じ新鮮培地(条件Cの培地添加剤を使用して)と交換し、細胞を更に48時間培養した。

【0108】

ステージ5(7日間) :

条件A、B、及びCについては、基本培地(「ステージ5+基本培地」)を、追加の1.75g/L重炭酸ナトリウム;MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA;1X濃度のGlutaMAX(商標);20mMグルコース;ITS-Xの1:200希釈物;250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸;10mg/Lのヘパリン(Sigma Aldrich;カタログ番号H3149-100KU)を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB-131培地ベースを使用して調製した。ステージ4の完了後、培地交換を完了し、300mLのステージ5+基本培地に1 μ MのT3(3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として)(「T3」)(Sigma Aldrich;カタログ番号T6397)、10 μ Mの2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン(nathyridine)(「ALK5阻害剤II」)(Enzo Life Sciences, Inc.;カタログ番号ALX-270-445)、100nMのセクレターゼ阻害剤X(X(EMD Millipore Corporation(Gibbstown, NJ)、カタログ番号565789);20ng/mLのベータセルリン(R&D Systems、カタログ番号261-CE-050);0.25 μ MのSANT-1;及び100nMのRAを補充した。ステージ5の開始の48時間後、使用済み培地を取り除き、300mLの同じ培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を取り除き、1 μ MのT3、10 μ MのALK5阻害剤II、20ng/mLのベータセルリン、及び100nMのRAを補充したステージ5+基本培地と置換した。48時間後、培地を再度交換し、1 μ MのT3、10 μ MのALK5阻害剤II、20ng/mLのベータセルリン、及び100nMのRAを補充したステージ5+基本培地と置換した。

【0109】

ステージ6(7日間) :

最後のステージ5の培地交換の24時間後、条件A、B、及びC用の培地を、1 μ Mの

10

20

30

40

50

T3及び10 µMのALK5阻害剤I Iを補充したステージ5 + 基本培地と交換した。ステージ6の2、4、及び6日目の最後にこの補充された培地と培地交換を行った。

【0110】

分化プロセスを通じて、懸濁培養から毎日サンプルを収集した。毎日の細胞サンプルをmRNAについて分離し(qRT-PCR)、使用済み培地を代謝分析のために収集した。選択したステージの最後で、タンパク質の発現をフローサイトメトリー又は蛍光免疫組織化学によって測定した。NOVA(登録商標)BioProfile(登録商標)FLEX bio-analyzer(Nova Biomedical Corporation(Waltham, MA))を使用して、使用済み培地を分析した。

【0111】

図1A~Dは、分化の毎日の終わりに使用済み培地サンプルから得られたNOVA(登録商標)BioProfile FLEX Analyzerからのデータを示している(図1A - pO₂/酸素分圧; 図1B - グルコース濃度; 図1C - 乳酸濃度; 図1D - 培地pH)。これらのデータは、分化細胞のステージ1の最初の3日間が、分化の後のステージと比べると最も酸素を消費することを実証している。ステージ1で細胞は、NOVA(登録商標)アナライザー(図1A)によって検出されるように飽和濃度の19+kPaから13kPa未満(140+mmHg~100mmHg未満)までpO₂濃度を減少させる。更に、ステージ1細胞は、培地中のほとんど全てのグルコースを消費し(図1B)、プロセスの最初の3日間でリットルあたり1グラム超の乳酸を生成した(図1C)。

【0112】

細胞が分化のステージ2及び3に移動したとき、酸素及びグルコースの消費及び乳酸の産生は、ステージ1と比較して変化した。ステージ1においてGDF8及びMCX化合物(条件A又はB)で処理された細胞は、ステージ1においてアクチビンA及びCHIR99021(条件C)で処理された細胞よりも、ステージ2においてより多く酸素を消費した(図1A)。この増加した酸素消費の観察結果は、条件A又はBを条件Cと比較すると、使用済み培地におけるより低いpH(図1D及び表1)、増加した乳酸産生(図1C)、及びより高いグルコース消費(図1B)と相関があった。

【0113】

細胞がステージ4(条件A及びBの10、11、及び12日目; 条件Cの9、10、11、及び12日目)まで進行したとき、条件A及びBで処理した細胞は、条件Cで処理した細胞と比較して、増加したグルコース消費のレベル及びより低い培地pHを保持した(図1B及び表1)。しかしながら、14日目(ステージ5の第2日目)から19日目(ステージ5の最後)まで、グルコース濃度が、全ての処理条件においてリットルあたり3グラムより低くならなかったことが観察された。ステージ6が開始するとすぐに、3条件全てにおいて(図1B、20日目以後)使用済み培地のグルコース濃度は、リットルあたり2.4グラムより低い傾向を示した。グルコース消費におけるこの増加は、全乳酸産生量においてリットルあたり0.5グラム超の増加も(図1C)使用済み培地の酸性化(図1D)も伴わず、細胞が、より少ない糖分解及びより成熟した代謝機能に変わり、膵島の内分泌ホルモン細胞集団と一致することを示唆した。

【0114】

毎日のサンプリングを通じて使用済み培地の代謝プロファイルを監視することに加え、細胞の代表的なサンプルを、分化プロセスを通じて得て、Applied Biosystems(登録商標)OpenArray(登録商標)(Life Technologies)によって遺伝子の集団のmRNA発現について試験し、実験の開始から培養下で24時間後の多能性ISM細胞と比較した発現の倍差として計算した。図2A~Mは、ステージ5の第1日目までに分化した細胞における次の遺伝子の発現に関するデータを示す。PDX1(図2A); NKX6.1(図2B); PAX4(図2C); PAX6(図2D)、NEUROG3(NGN3)(図2E); ABC C8(図2F); クロモグラニン-A(「CHGA」)(図2G); G6PC2(図2H); IAPP(図2I); インスリン(「INS」)(図2J); グルカゴン(「GCG」)(図2K); PTF1a(図

10

20

30

40

50

2 L) ; 及び NEUROD1 (図 2 M) 。

【 0 1 1 5 】

図 2 A に示されるように、3つの分化条件全てにおいて、ステージ2の3日目(「S2D3」)の終わりまでに細胞は、PDX1を発現し始め、膵臓運命を示す。細胞がステージ3に入ると、細胞は、膵内分泌腺の特異化を示す遺伝子(NGN3、NEUROD1、及びCHGA; 図2E、2M、及び2G)を発現し始め、ステージ3の終わり及びステージ4の開始までに細胞形成に必要な遺伝子(PAX4、PAX6、及びNKX6.1; 図2C、2D、及び2B)を発現し始めた。ステージ5の開始までに、細胞は、島及び細胞の形成及び機能に必要なマーカー(GCG、INS、IAPP、G6PC2、及びABCC8; 図2K、2J、2I、2H、及び2F)を発現し始めた。

10

【 0 1 1 6 】

サンプルは、ステージ5及び6を通じても収集され、OpenArray(登録商標)リアルタイムPCR分析によって以下の遺伝子発現について分析した。PDX1(図3A); NKX6.1(図3B); PAX6(図3C); NEUROD1(図3D)、NEUROG3(NGN3)(図3E); SLC2A1(図3F); PAX4(図3G)、PCSK2(図3H)、クロモグラニン-A(図3I); クロモグラニン-B(図3J); PPY(図3K); PCSK1(図3L); G6PC2(図3M)、グルカゴン(図3N); 及びインスリン(図3O)。図3A~3Dに示されるように、PDX1、NKX6.1、PAX6、及びNEUROD1発現濃度は、ステージ5の3日目(「S5D3」)からステージ6の7日目(S6D7)の終わりまで安定していたことが観察された。NGN3、SLC2A1、及びPAX4のmRNA発現濃度は、細胞がセクレターゼ阻害剤(ステージ5の1~4日目)にさらされた間最高濃度であり、また発現濃度はセクレターゼ阻害剤(図3E~3G)の除去を受けて低下した。遺伝子PCSK2、CHGA、及びCHGBは、ステージ5の最後に発現の増加を示したが(図3M~3O)、遺伝子PPY、PCSK1、G6PC2、GCG、及びINSは、ステージ5の開始からステージ6の最後まで連続的に上がった(図3K、3L、3M、3N、3O)。

20

【 0 1 1 7 】

様々なステージの追加的な特徴付けのために、細胞をステージ1、4、5、及び6の最後に採取し、フローサイトメトリーによって解析した。手短かに言えば、細胞凝集体は、TrypLE(商標)Express(Life Technologies; カタログ番号12604)を37で3~5分間使用して、単一細胞に分解された。表面染色については、遊離した単一細胞を、2,000,000細胞/mLの最終濃度で染色緩衝液に1:4に希釈した0.5%ヒトグロブリンに再懸濁させた。1:20の最終希釈で細胞に、直接共役一次抗体を添加し、続いて4で30分間インキュベーションした。染色した細胞を、染色緩衝液中で2回洗浄し、続いて300µL染色緩衝液中に再懸濁した後、BD FACSCanto(商標)II上のフローサイトメトリー解析の前に、生/死区別のために、10µLの7-AAD中でインキュベートした。細胞内抗体染色では、単一細胞は、最初にViolet Fluorescent LIVE/DEAD cell dye(Life Technologies, カタログ番号L34955)を用いて4で20~30分間インキュベートし、続いて冷たいPBSで単回洗浄した。次いで、洗浄した細胞を4で30分間、280µLのCytifix/Cytoperm(商標)Fixation and Permeabilization Solution(BDカタログ番号554722)中で固定した。次に細胞を、2,000,000細胞/mLの最終濃度で再懸濁される前に、1xPerm/Wash Buffer(BDカタログ番号51-2091KZ)で2回洗浄した。固定した細胞懸濁液を、次に20%正常ヤギ血清を10~15分間室温で使用してブロックした。細胞を、実験的に事前決定された希釈で一次抗体と4で30分間培養し、続いてPerm/Wash緩衝液中で2回洗浄した。次いで細胞を、適切な抗体と4で30分間インキュベートした後、BD FACSCanto(商標)II上の解析前に2回洗浄した。使用した抗体の濃度を表I Iに示す。膵臓マーカーのための抗体は、ヒト膵島又は未分化H1細胞を陽性対照として

30

40

50

使用し、特異性について試験した。二次抗体については、次のように、anti-mouse Alexa Fluor (登録商標) 647 (1:4, 000で) (Life Technologies, カタログ番号 A21235) 又は goat anti-rabbit PE (1:100、1:200若しくは1:800で) (Life Technologies, カタログ番号 A10542) を追加して4 で30分間インキュベートし、続いてPerm/Wash緩衝液中での最終洗浄、及び取得された少なくとも30,000イベントによりBD FACSDiva (商標) Softwareを使用してBD FACSCanto (商標) IIで解析を行った。

【0118】

図4は、表面マーカーCD184及びCD9；又はCD184及びCD99 (表IIIAに要約される) に関して共染色されたステージ1の終わりに得られる生細胞についてのフローサイトメトリードットプロットを示す。図5は、次の対の細胞内マーカーに関して共染色されたステージ4の終わりからの、固定され、透過処理された細胞についてのフローサイトメトリードットプロットを示す。NKX6.1及びクロモグラニン-A；Ki67及びPDX1；並びにNKX2.2及びPDX1 (表IIIAに要約される)。図6A及びB (条件A)、7A及びB (条件B)、並びに8A及びB (条件C) は、次の対の細胞内マーカーに関して共染色されたステージ5の終わりからの、固定され、透過処理された細胞についてのフローサイトメトリードットプロットを示す。NKX6.1及びクロモグラニン-A；NKX2.2及びクロモグラニン-A；NKX6.1及びCペプチド；グルカゴン及びインスリン；Ki67及びPDX1；OCT4及びPAX6；NKX6.1及びNEUROD1；NKX6.1及びインスリン；並びにNKX6.1及びPDX1。図9A及びB (条件A)、10A及びB (条件B)、並びに11A及びB (条件C) は、共染色された、対となる細胞内マーカーのフローサイトメリーによって染色され、測定されたステージ6の終わりからの、固定され、透過処理された細胞を示す。NKX6.1及びクロモグラニン-A；NKX2.2及びクロモグラニン-A；グルカゴン及びインスリン；NKX6.1及びCペプチド；インスリン及びCペプチド；Ki67及びPDX1；OCT4及びPAX6；NKX6.1及びNEUROD1；NKX6.1及びインスリン；並びにNKX6.1及びPDX1。

【0119】

ステージ5の終わりで、図6A、7A、及び8Aに示され、表IIIBに要約されるように、条件A、B、又はCで分化された細胞の17%、12%、又は10%は、インスリン及びNKX6.1をそれぞれ共発現した。ステージ6の完了時に、NKX6.1及びインスリン共発現細胞の数において増加が観察された(31%(条件A)、15%(条件B)、14%(条件C))。更に、細胞のほぼ大半がステージ6の終わりに細胞前駆マーカーNKX6.1、内分泌前駆マーカーNKX2.2、及び内分泌腺前駆マーカーNEUROD1 (条件A - 74% NKX6.1、82% NKX2.2、74% NEUROD1；条件B - 75% NKX6.1、76% NKX2.2、67% NEUROD1；条件C - 60% NKX6.1、64% NKX2.2、53% NEUROD1) を発現したことが留意された。

【0120】

細胞の成熟及び機能に必要なマーカーの増加した発現に加えて、PDX1及びKi67の共発現で測定される活性細胞周期内のPDX1陽性細胞の割合は、ステージ5からステージ6で低下したことが観察された(26%から9%に低下、条件A；22%から10%に低下、条件B；43%から19%に低下、条件C)。更に、フローサイトメリーによって測定されたKi67の発現が、3つの試験した条件全てにおいてステージ5及び6の過程で低下するとき、出願者らは、TaqMan (登録商標) qRT-PCRによって、細胞特異的転写因子MAFAの濃度の増加を検出した。ステージ6の終わりのMAFA発現は、未分化の多能性幹細胞より40+倍高く、またヒト島組織で観察される発現の約25%である濃度に達した(図12)。MAFAのタンパク質発現は、免疫蛍光核MAFA染色、免疫蛍光細胞質インスリン染色、及び汎核染色(「DAPI」)の2

10

20

30

40

50

0倍対物レンズによって得られる顕微鏡写真を示している図13に示されるように免疫蛍光細胞化学によって確認された。

【0121】

上述されたこれらの結果は、ステージ5からステージ6に移動する細胞が、増殖性膵内分泌前駆細胞から内分泌細胞に変化したことを示す。これらの内分泌組織、及び具体的にインスリン陽性細胞は、機能性細胞に関連する、かつ機能性細胞に必要なキーマーカーを発現した。ステージ3及び4に関して、条件Cにおけるよりも、細胞が著しく低いpHで培養された条件A及びBは、条件Cに比べて6ステージ目の分化プロセスの終わりにまでクロモグラニン陽性、Cペプチド/NKX6.1共陽性細胞、及びNEUROD1/NKX6.1共陽性細胞をより多く生成した。条件Cは、当該技術分野において既知であり、かつCell, 159: 428~439 (2014)に開示された方法である。

10

【0122】

ステージ6を通して条件A及びCによって分化された細胞を、培地から50mL円錐に分離し、次いで追加の1.2g/L重炭酸ナトリウム及び0.2%w/vのFAF-BSAを補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB-131培地で2回洗浄した。細胞を次に洗浄培地に再懸濁させ、NSGマウス(N=7)の腎臓被膜下への移植前に室温にて約5時間保持した。動物は、血糖及びCペプチドレベルについて、生着の4、8、10、及び14週間後に監視された。動物は、一晚絶食し、グルコースの腹腔内注射を与えられ、IPグルコースポラス注射の60分後(「ポスト」)に血液が眼窩後方出血により採血された(表III)。最も早く測定した時点(生着後4週間)で、検出可能な濃度のCペプチドの分泌で測定したところ移植片は機能した(表IV)。更に、Cペプチド濃度は、4週目から14週目まで上昇した。

20

【0123】

移植10週間後に、それぞれの動物は、グルコースポラス注射の直前(「プレ」)及びグルコースポラス注射の直後(「ポスト」)に採血された。参考までに、「プレ」濃度より高かった「ポスト」Cペプチド濃度は、グルコースがインスリン分泌を刺激したことを示す。出願者らは、条件Cによって分化された移植片で処理された7匹の動物のうち6匹は、より高いCペプチドの「ポスト」濃度を示し、条件Aによって分化された移植片で処理された7匹の動物のうち3匹は、より高いCペプチドの「ポスト」濃度を有したことに留意した。

30

【0124】

【表2】

表I. 使用済み培地からの毎日のpH測定値; 実施例1、ステージ3、1日目～ステージ5、2日目。

ステージ及び日	条件AのpH	条件BのpH	ステージ及び日	条件CのpH
S3D1	7.19	7.12	S3D1	7.31
S3D2	7.29	7.25	S3D2	7.39
S3D3	7.18	7.22	S4D1	7.44
S4D1	7.11	7.28	S4D2	7.37
S4D2	7.04	7.21	S4D3	7.48
S4D3	7.08	7.19	S4D4	7.43
S5D1	7.44	7.45	S5D1	7.48
S5D2	7.35	7.41	S5D2	7.46

40

【0125】

【表 3】

表II. 実施例1で生成された細胞のFACS解析で使用される抗体のリスト			
抗原	種	供給元／カタログ番号	希釈
グルカゴン	マウス	Sigma-Aldrich Co. LLC/G2654	1:500
インスリン	ウサギ	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA/3014B	1:10
NKX6. 1	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa/F55A12	1:50
NKX2. 2	マウス	Developmental Studies Hybridoma Bank/74. 5A5	1:100
PDX1	マウス	BD BioSciences, San Jose, CA/562161	1:20
Ki67	マウス	BD Biosciences/561126	1:20
PAX6	マウス	BD Biosciences, 561552	1:20
クロモグラニンA	ウサギ	Dako, Carpinteria, CA/1S502	1:10
ISL-1	マウス	BD Biosciences/562547	1:20
NEUROD1	マウス	BD Bioscience/563566	1:40
FOXA2	マウス	BD Bioscience/561589	1:80
OCT3/4	マウス	BD Biosciences/560329	1:20
Cペプチド	ウサギ	Cell Signaling Technology/#4593S	1:100
インスリン	マウス	Abcam/#7760	1:800

10

20

【 0 1 2 6 】

【表 4】

表 I I I A

名称	CD9	CD184	SSEA4	TRA-1-60	TRA-1-81
多能性(Pluripotency) SOD3-24H BX1	82	0	100	90	76
	CD9	CD184	CD99		
DE;S1D3-24H					
SF A	52	99	95	---	---
SF B	43	99	98	---	---
SF C	17	99	100	---	---
	NKX6. 1	CHGA	NKX2. 2	PDX1	NEUROD1
ステージ4 S4D3-24H					
SF A	73	21	25	100	23
SF B	69	12	14	99	14
ステージ4 S4D4-24H SF C	53	10	13	96	12

30

40

【 0 1 2 7 】

【表 5】

表 I I I B

	ステージ5 S5D7-24H SF A	ステージ5 S5D7-24H SF B	ステージ5 S5D7-24H SF C	ステージ6 S6D8-24H SF A	ステージ6 S6D8-24H SF B	ステージ6 S6D8-24H SF C
NKX6. 1	74	69	62	74	75	60
CHGA	39	55	32	61	61	47
NKX6. 1+/ CHGA	25	35	17	44	43	21
PDX1	99	95	97	94	89	82
NKX6. 1+/ PDX1+	68	61	99	74	66	54
Ki67+/ PDX1+	26	22	43	9	10	19
NEUROD1	60	63	33	74	67	53
NKX6. 1+/ NEUROD1+	40	38	19	53	45	28
NKX6. 1+/ C-PEP+	26	15	22	29	27	21
NKX6. 1+/ INS+	17	12	10	31	15	14
C-PEP+/ INS+	30	27	22	38	25	28
NKX2. 2	65	71	38	82	76	64

10

20

【 0 1 2 8 】

【表 6】

表 I V

状態	細胞適用量 (%INS/NKX6. 1 共陽性)	Cペプチド ng/mL(4wk)	Cペプチド ng/mL(8wk)	Cペプチド ng/mL(10wk)	Cペプチド ng/mL(14wk)
A	5M(32%)	0. 716	1. 056	0. 975	2. 18
C	5M(14%)	0. 406	0. 641	1. 052	1. 39

30

【 0 1 2 9 】

(実施例 2)

この実施例は、リアクター内のフィードバック pH 及び DO センサーによる培地 pH 及び溶存酸素濃度の直接コンピュータ制御を可能にした、攪拌タンクの閉じたループ内で PDX1 を発現する細胞の集団からのインスリン発現細胞の形成を実証する。このプロセスから生成されたインスリン陽性細胞は、PDX1 発現を保持し、NKX6. 1 を共発現した。インスリン陽性細胞は、ステージ 3 ~ 5 において 4 つの異なる条件 (A、B、C、及び D) にさらされた細胞から生成された (表 V)。条件 C (ステージ 3 の開始時に pH 7. 0 及び 2, 0 0 0, 0 0 0 / mL の細胞濃度) に従って分化された細胞を、免疫力が低下したマウスの腎臓被膜の中に移植したとき、移植片が検出可能な血中濃度のヒト C ペプチドを生着の 4 週間以内に産生したことが観察された。

40

【 0 1 3 0 】

ヒト胚幹細胞株 H1 (WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin)) の細胞を、動的懸濁液の状態の、0. 5 % w / v の FAF - BSA を補充した E8 (商標) で、丸い凝集集団として 4 の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び 2 ~ 1 0

50

細胞の集団として凍結した。凝集集団内の約600,000,000~1,000,000,000細胞を、遠心管に移し、100mLの1X DPBS-/-を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットにStemPro(登録商標)Accutase(登録商標)酵素を50体積%、及びDPBS-/-を50体積%の溶液30mLを添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで1~3度上下させてから、断続的に室温で約4分間巡回させ、その後80~200rcfで5分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase(登録商標)の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約4分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び2~10細胞からなる集団にほぐした。4分後、細胞を、10μMのY-27632(Enzo Life Sciences, Inc.(Farmingdale, NY);カタログ番号ALX-270-333)及び0.5%w/vのFAF-BSAを補充した100mLのE8(商標)培地に再懸濁させ、80~200rcfで5~12分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mLあたり100,000,000~150,000,000細胞の最終濃度を得るために冷たい(4)Cryostor(登録商標)Cell Preservation Media CS10を滴加した。この細胞溶液を、2mLの極低温バイアルに小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレートフリーザー(CryoMed(商標)34L Controlled-Rate Freezer)を使用して細胞を凍結した。チャンバを4に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が6に達するまで保持し、次に試料が-7に達するまでチャンバの温度を毎分2下げ、その時点でチャンバが-45に達するまでチャンバを20/分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が-25に達するまで10/分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが-40に達するまで0.8/分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが-100に達するまで10/分で冷却し、その時点で、次にチャンバが-160に達するまでチャンバを35/分冷却した。チャンバの温度を、次に-160で少なくとも10分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保存庫に移動した。これらの高濃度で凍結保存した単一細胞を中間/処理中の種材ISMとして次に使用した。

【0131】

ISMのバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクDASGIPバイオリアクターに播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、37の水浴に120秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、BSCに移動させ、解凍された内容物を、2mLガラスピペットを介して50mL円錐管に移した。次に、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのRhoキナーゼ阻害剤Y-27632を補充した10mLのE8(商標)培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80~200rcfで5分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した10mLの新鮮なE8(商標)培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した450mLのE8(商標)培地を収容する培地移動ボトル(Cap2V8)内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌C-Flux(登録商標)チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリアクター内に直接ポンプで注入した。37に予熱し、70rpmで攪拌した、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した1000mLのE8(商標)培地で、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)、及び5%の制御されたCO₂分圧によって、バイオリアクターを調製した。0.225×10⁶細胞/mL(濃度範囲:0.2~0.5×10⁶細胞/mL)の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

【0132】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5%w/vのFAF-BSAを補充した1.5LのE8(商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部

10

20

30

40

50

分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、分化誘導が開始された。分化を開始するために、使用済み培地を取り出し、分化培地をバイオリアクター内にポンプで注入し、以下に説明したように培地0の交換及び分化プロトコルを使用したプロセスの過程で交換した。

【0133】

ステージ1(3日間)：

基本培地を、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース(4.5%水溶液)；及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB-131培地を使用して調製した。細胞を、100ng/mLのGDF8及び3µMのMCX化合物を補充した1.5Lの基本培地で1日間培養した。24時間後、使用済み培地を取り除き、100ng/mLのGDF8を補充した新鮮な1.5Lの基本培地をリアクターに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。

10

【0134】

ステージ2(3日間)：

基本培地を、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有し、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、MCDB-131培地を使用して調製した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した1.5Lのステージ2基本培地と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した1.5Lの新鮮なステージ2基本培地と置換した。

20

【0135】

ステージ3(3日間)：

ステージ2の完了時、かつ培地交換の直前に、無菌溶接及び蠕動ポンプを介して、3リットルリアクターから900,000,000細胞を取り出した。3リットルリアクター内の培地を次に前述のように交換し、以下のステージ3培地と置換した。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCDB-131培地。ステージ3培地に50ng/mLのFGF-7；100nMのLDN-193189；2µMのRA；0.25µMのSANT-1；及び400nMのTPBを補充した。取り出した細胞を次に無菌円錐管内で遠心沈殿させ、使用済み培地を取り除き、細胞をステージ3培地及び添加剤に再懸濁させた。これらの細胞を次に、無菌溶接及び蠕動ポンプを介して4つの別個のDASGIP(商標)より提供される0.2リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター(リアクターA、B、C、及びD)に移した。0.2リットルのバイオリアクター及び3リットルの対照バイオリアクター内の細胞を、ステージ3~5に関して図14及び表Vに示されるように、細胞濃度及び培地pHの異なる組み合わせにさらした。培地交換24時間後、使用済み培地を、対照及びリアクターA~DのそれぞれにおいてLDN-193189を除いて、上記添加剤を含む300mLの新鮮なステージ3培地と再度置換した。その培地で48時間細胞を培養した。

30

40

【0136】

【表 7】

表 V

	pH設定値 ステージ3	DO設定値 ステージ3	pH設定値 ステージ4	DO設定値 ステージ4	ドリフトpH 設定値 ステージ5	ドリフトDO 設定値 ステージ5	細胞濃度
対照 リアクター	7.4	30%	7.4	30%	スピナー フラスコに 移動した	スピナー フラスコに 移動した	1.32×10^6 細胞/mL
リアクターA	7.4	30%	7.4	30%	ヘッドスペース スパージ5%； 一定のCO ₂	ヘッドスペースス パーズ20%； 一定のO ₂	2.0×10^6 細胞/mL
リアクターB	7.4	30%	7.4	30%	スピナー フラスコに 移動した	スピナー フラスコに 移動した	1.0×10^6 細胞/mL
リアクターC	7.0	30%	7.4	30%	ヘッドスペース スパージ5%； 一定のCO ₂	ヘッドスペース スパージ20%； 一定のO ₂	2.0×10^6 細胞/mL
リアクターD	7.0	30%	7.4	30%	スピナー フラスコに 移動した	スピナー フラスコに 移動した	1.0×10^6 細胞/mL

10

【0137】

ステージ4（3日間）：

ステージ3の完了後、使用済み培地を取り除き、150 mLの以下のステージ4培地と置換した。追加の2.4 g/L重炭酸ナトリウム；MCD B - 131に予め再構成された2% w/vのFAF - BSA；1X濃度のGlutaMAX（商標）；2.5 mMグルコース；及びITS - Xの1：200希釈物を補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する150 mLのMCD B - 131培地。培地に0.25 μMのSANT - 1及び400 nMのTPBを補充した。ステージ4の開始の48時間後、3.2 mL/Lの45%グルコース溶液（8 mMグルコースポラス）をバイオリアクターのそれぞれに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。

20

【0138】

ステージ5（7日間）：

ステージ5基本培地を、追加の1.754 g/L重炭酸ナトリウム；MCD B - 131に予め再構成された2% w/vのFAF - BSA；1X濃度のGlutaMAX（商標）；20 mMグルコース；ITS - Xの1：200希釈物；250 μL/Lの1 Mアスコルビン酸；及び10 mg/Lヘパリン（Sigma Aldrich；カタログ番号H3149 - 100KU）を補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する150 mLのMCD B - 131培地ベースを使用して各バイオリアクター用に調製した。ステージ4の完了後、各バイオリアクター内の使用済み培地を、1 μMのT3、10 μMのALK5阻害剤II、1 μMのセクレターゼ阻害剤XXI（EMD Millipore；カタログ番号565790）；20 ng/mLのベータセルリン；0.25 μMのSANT - 1；及び100 nMのRAを補充した、150 mLのステージ5基本培地と交換した。ステージ5の開始の48時間後、使用済み培地を取り除き、150 mLの同じ新鮮培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を取り除き、1 μMのT3、10 μMのAlk5阻害剤II、20 ng/mLのベータセルリン、及び100 nMのRAを補充したステージ5基本培地と置換した。48時間後、培地を再度交換し、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換した。24時間後ステージ5の終わりを示し、生成された細胞を特徴付け及び解析のために処理した。

30

40

【0139】

分化プロセスを通じて、pH及び溶存酸素（「DO」）についてのリアルタイム連続監視に加えて、培地サンプルを毎日リアクターから収集した。毎日の終わりに使用済み培地をNOVA bio-analyzerによって解析した。サンプルを、細胞数（Nuc

50

leocounter 100)、mRNA発現(qRT-PCR)、及びタンパク質発現(フローサイトメトリー及び蛍光(florescent)免疫組織化学)についても解析した。

【0140】

図15A及びBは、ステージ3及び4の過程でリアクター1、A、B、C、及びDの培地におけるpH(図15A)及び溶存酸素濃度(図15B)の連続監視グラフを示す。図16A及びBは、ステージ3及び4における分化の毎日の終わりに使用済み培地サンプルから得られるNOVA(登録商標)BioProfile FLEX Analyzerからのデータを示している(図16A-グルコース濃度;図16B-乳酸濃度)。図17は、リアクター及び条件A、B、C、及びDについて細胞カウントの傾向線を示している(BxA、BxB、BxC、及びBxDとしても列挙される)。これらのデータは、pH 7.0に設定されるリアクターにおいて、ステージ3の過程で細胞損失が存在することを実証し、これは低いpH(バイオリアクターC及びD)設定値と相関している。しかしながら、mLあたり 2×10^6 細胞で播種されたリアクターCは、ステージ4の終わりまでに細胞集団を回復した一方、7.0のpHを有するがmLあたり 1.0×10^6 細胞の細胞播種を有したリアクターDは回復しなかった。また、7.4のpH、かつmLあたり 2×10^6 及び 1.0×10^6 細胞で播種された、リアクターA及びBは、両方ともステージ3を通して細胞濃度を維持していたがそれぞれステージ4で著しい細胞損失を呈した(図17)。これらのデータは、ステージ3でのmLあたり約 1.5×10^6 細胞以上、好ましくは、mLあたり約 2.0×10^6 細胞以上の濃度と組み合わせた7.0のpH設定値の使用が、ステージ3においてpH 7.4で維持された細胞と比較して、後続の分化ステージを通してより高い細胞濃度を促進することを示す。

10

20

【0141】

細胞濃度への効果は、グルコース及び乳酸の毎日の使用済み培地濃度に反映される。リアクターC及びDの両方は、pH 7.4対照群、A及びBそれぞれと対になるその濃度より毎日の終わりに残量の多いグルコース及び少ない乳酸を有した。これらの結果は、リアクターC及びDがステージ3の間、低い代謝活性を有したことを示した。しかしながら、リアクターCがステージ4を通して進行したとき、乳酸濃度は、リアクターCにおいて低いままであったが、残留グルコース濃度は、ステージ4の第1及び第2日目の終わりまでリアクターA内のものと同程度であった。これらのデータから、出願者らは、リアクターC内の細胞がリアクターA内のものよりも、分化され、成熟した、かつ少ない糖分解の表現型をとり始めたと推論することができる。

30

【0142】

ステージ3の完了時、1M(リアクターB)又は2M(リアクターA)の開始密度でpH 7.4に維持された細胞は、低pH処理細胞が臍内胚葉の特異化を保持することを示すことを観察されたが、 1×10^6 (リアクターD)又は 2×10^6 (リアクターC)細胞/mLの開始濃度でpH 7.0に維持されたほとんど全ての細胞は、内胚葉転写因子(FoxA2)及び臍特異的転写因子(PDX1)の両方を発現することが観察された。更に、5つ全ての試験した条件において、NKX6.1を発現する細胞の割合は、ステージ3の終わりで同様に低かった(範囲: 5.4~13.6%)。pH 7.4に維持された細胞(リアクターA及びB、並びに対照リアクター、「1」)は、ステージ3の終わりでNEUROD1を発現し始めたが、pH 7.0(リアクターC及びD)で維持された細胞は、フローサイトメトリーによって測定した場合NEUROD1発現のレベルの減少を示した(表VI)。ステージ4の開始時、リアクターC及びDのpH設定値を、7.4に戻した(図14及び15A)。3日後、ステージ4の終わりに、リアクターのそれぞれからのサンプルを、フローサイトメトリーによってNKX6.1、NEUROD1、PDX1、FoxA2、CDX2、及びKi67の発現について解析した。ステージ3においてpH 7.0に維持された細胞(リアクターC及びD)は、表VIに要約されるように7.4のpHに設定されたリアクター(バイオリアクター1、A、及びB)で維持された細胞と比較すると、細胞内フローサイトメトリーによって検出されるようにステージ4の終わりに、実質的により多くのNKX6.1陽性細胞及び活性細胞周期にある細胞(Ki67陽性)

40

50

を有したことが観察された。

【0143】

フローサイトメトリーによって細胞タンパク質発現を判定することに加えて、分化プロセスのステージ3及び4を通してサンプルを、Open Array（登録商標）qRT-PCRを使用して遺伝子パネルのmRNA発現について試験した。図18A～Nは、分化させてからステージ4の第2日目までヒト胚性幹細胞株H1の細胞における以下の遺伝子のリアルタイムPCR解析のデータを示す。PDX1（図18A）、NKX6.1（図18B）、PAX4（図18C）、PAX6（図18D）、NeuroG3（NGN3）（図18E）、ABCC8（図18F）、クロモグラニン-A（図18G）、クロモグラニン-B（図18H）、ARX（図18I）、グレリン（図18J）、IAPP（図18K）、PTF1a（図18L）、NEUROD1（図18M）、及びNKX2.2（図18N）。

10

【0144】

図18Aに示されるように、低（7.0）又は標準（7.4）pHの両方の分化条件下で、細胞は、ステージ3を通して膵臓運命をとる細胞と類似のレベルのPDX1を発現した。pH7.4リアクターからの細胞が、ステージ3を通して進行したとき（リアクターBX A及びBX B）、NKX6.1の発現が相対的に無い状態では（図18B）、細胞は早期の膵内分泌細胞の発達に必要な特徴的な複数の遺伝子を発現し始めた。図18C、18D、18E、18M、18N、18I、18J、18G、及び18Hに示されるようにPAX4、PAX6、NGN3、NEUROD1、NKX2.2、ARX、グレリン、CHGA及びCHGB。低いNKX6.1の発現と組み合わせたこの遺伝子発現のパターンは、いくつかの早期の（非細胞）膵内分泌腺の特異化を示した。

20

【0145】

対照的に、リアクターC及びDからの細胞（ステージ3、pH7.0）は、Open Array（登録商標）qRT-PCRで測定すると、ステージ3において、リアクターA及びBと比較して著しく低い濃度の、内分泌腺発達に必要な転写因子（PAX4、PAX6、NGN3、NEUROD1、NKX2.2、及びARX）を発現した（図18C、18D、18E、18M、18N、及び18I）。更に、リアクターC及びDからの細胞は、ステージ4の1日目にNKX6.1（細胞形成に必要な転写因子）が増加し、その後ステージ4の2日目にPAX6、NEUROD1、及びNKX2.2の発現が増加した（図18D、18M、18N、及び18B）ことが観察された。これらのqRT-PCRデータは、ステージ3において7.0pHで維持された細胞について、ステージ3及び4の終わりにNEUROD1を発現する細胞の割合が減少し、NKX6.1を発現する細胞数が増加したことを実証したフローサイトメトリー結果に相関した（表VI、図19、及び図20）。これらのデータは、ステージ3における低pH（7.0）が早期の（非細胞）膵内分泌腺の特異化を阻害し、細胞を形成するのに必要な転写因子発現シーケンスを活性化することを示唆した。

30

【0146】

遺伝子の発現の遅延又は低下の効果は、非細胞膵内分泌腺の特異化に関与し、ステージ3で減少した培地pHを通じ、分化のステージ5を通して持続した。NGN3遺伝子発現は、発達中の膵臓において適切な内分泌ホルモン細胞の発達のために必要とされ、条件A（pH7.4）及びC（ステージ3にてpH7.0）の両方において、NGN3の発現は、セクレターゼ阻害剤を含有するステージ5培地を用いた細胞の処理に反応して誘導された。しかしながら、条件C細胞に従って分化された細胞について、ピークのNGN3発現に1日の遅れが認められた（図21A）。更に、NGN3発現によって誘導又は調節された複数の遺伝子もまた、条件Cによって分化された細胞（ステージ3にてpH7.0）において遅れがあった。NEUROD1（図21B）、NKX2.2（図21C）、ARX（図21D）、クロモグラニンA/CHGA（図21E）、及びPCSK2（図21F）などの内分泌腺特異的な遺伝子は全て、NGN3と同様に発現において遅れを示した。しかしながら、細胞と特異的に関連する遺伝子であるABCC8（図21G）、G6

40

50

CP2 / グルコース 6 ホスファターゼ (図 2 1 H)、インスリン / INS (図 2 1 I)、Islet 1 / ISL 1 (図 2 1 J)、グルコース輸送体 1 / SLC 2 A 1 (図 2 1 K)、亜鉛輸送体 / SLC 3 0 A 8 (図 2 1 L)、及び NKX 6 . 1 (図 2 1 M) は、条件 A 及び C からの細胞において同時にかつ同規模で現れる。更に、機能的細胞の適切な成熟に関連する遺伝子である UCN 3 の発現は、ステージ 3 における pH 7 . 0 への曝露がこのプロセスにおいて様 (lie) 細胞への後期の成熟を促進することを示す図 2 1 N に示されるように、pH 7 . 4 (リアクター A) で維持された細胞と比較すると、リアクター C (ステージ 3 にて pH 7 . 0) で分化された細胞においてステージ 5 を通じて増加した。

【 0 1 4 7 】

UCN 3 発現における増加に加えて、qRT - PCR によって細胞特異的転写因子である MAF A の発現における増加もまた観察された。MAF A 発現は、セクレターゼ阻害剤の追加の後、ステージ 5 の 1 日目 (図 2 1 O) に単一のプライマープローブ qRT - PCR アッセイによって試験された 3 つの条件全てにおいて (A、B、及び C) 最初に検出可能であった。ステージ 4 の 3 日目からステージ 5 の 5 日目まで、検出可能な MAF A の mRNA 発現は、条件 A 又は B においてより条件 C において高かった。MAF A のタンパク質発現は、免疫蛍光細胞化学によってステージ 6 の終わりに確認された。図 2 2 に示されるように、20 倍対物レンズによって得られる顕微鏡写真は、核の MAF A 及び細胞質のインスリン染色に関する免疫蛍光染色を示す。

【 0 1 4 8 】

これらの遺伝子発現パターンは、ステージ 3 での低 pH への曝露による早期の内分泌腺の特異化の抑制は、細胞特異的転写因子の発現前に、早期の非細胞運命の選択を低減することによって細胞様運命への後期の分化を促進することができることを示唆する。フローサイトメトリーの結果は、リアクター C で分化された細胞は、NKX 6 . 1 / インスリン共陽性細胞 (21 . 3 %、条件 C 対 15 . 6 %、条件 A) での増加と共に、条件 A 細胞 (20 . 3 %、表 VI) と比較するとインスリン陽性細胞の割合 (27 . 3 %、表 VI) が増加したので、この仮説を支持した。

【 0 1 4 9 】

興味深いことに、ステージ 3 における低 pH 及び細胞様運命への後期の分化は、その他の膵内分泌腺運命に特徴的な遺伝子発現を抑制しなかった。qRT - PCR によって、ステージ 5 (図 2 1 P - P P Y、2 1 Q - グレリン、2 1 R - G C G、及び 2 1 S - S S T) の終わりに分析されたサンプル中の内分泌ホルモン膵臓ポリペプチド (「P P Y」)、グレリン、グルカゴン (「G C G」)、及びソマトスタチン (「S S T」) について、遺伝子発現を観察した。この観察結果は、分化された細胞が表 VII 及び図 2 3 に示されるように汎内分泌系転写因子、NEUROD 1 に対して陽性であった (条件 C に対して NEUROD 1 陽性が 63 . 1 %、及び NEUROD 1 / NKX 6 . 1 共陽性の細胞が 56 . 1 % ; 条件 A に対して NEUROD 1 陽性が 51 . 6 %、及び NEUROD 1 / NKX 6 . 1 共陽性の細胞が 43 %) ことを示すフローサイトメトリーのデータによって更に支持された。

【 0 1 5 0 】

ステージ 5 の第 7 日目の終わりに、ステージ 3 にて pH 7 . 0 の設定値 (条件 C) で分化された 5×10^6 細胞を 50 mL 円錐内の培地から分離し、次いで合計 2 . 4 g / L 重炭酸ナトリウム及び 0 . 2 % w / v の FAF - BSA を含有する MCD B - 1313 培地で 2 回洗浄した。細胞を洗浄培地に再懸濁させ、NSG マウスの腎臓被膜下への移植前に室温にて約 5 時間保持した。最も早く測定した時点、移植 4 週間後、夜間絶食、腹腔内グルコース注射、及び IP グルコースポラス 60 分後の眼窩後方採血の後に平均ヒト C ペプチド血中濃度の 0 . 3 ng / mL が観察された (N = 7 動物)。

【 0 1 5 1 】

10

20

30

40

【表 8】

表 V I ; フローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

		NKX6. 1	NEUROD1	PDX1	FOXA2	CDX2	Ki67
S3D3	BX 1	8. 3	30. 9	99. 9	99. 7	0. 3	43. 8
S3D3	BX A	13. 6	36. 5	99. 8	99. 4	5. 2	41. 8
S3D3	BX B	6. 1	37. 3	99. 6	99. 8	1. 5	46. 7
S3D3	BX C	11. 6	15. 8	99. 5	99. 1	8. 3	51. 2
S3D3	BX D	5. 8	0. 6	99. 9	99. 8	5. 9	78. 9
		NKX6. 1	NEUROD1	PDX1	FOXA2	CDX2	Ki67
S4D3	BX 1	45	44. 7	98. 2	98. 6	5. 7	39. 9
S4D3	BX A	60. 5	35. 1	99. 3	99. 3	4. 3	45. 6
S4D3	BX B	39. 7	37. 5	98. 8	99. 3	4. 2	47. 5
S4D3	BX C	80	13. 6	99. 7	99. 8	2. 7	58. 9
S4D3	BX D	89. 8	5. 3	98. 3	98	5. 1	68

10

20

【 0 1 5 2 】

【表 9】

表 V I I ; ステージ 5 の 6 日目 (S 5 D 6) の終わりのフローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

30

状態	NKX6. 1	PDX1	NEUROD1 (NEUROD1+/NKX6. 1+)	インスリン (NKX6. 1+/インスリン+)	Ki67
BX A (pH7. 4)	61. 4	94. 5	51. 6 (43)	20. 3 (15. 6)	21. 7
BX C (pH7. 0)	76. 4	94. 7	63. 2 (56. 1)	27. 3 (21. 3)	20. 9

【 0 1 5 3 】

(実施例 3)

40

この実施例は、攪拌タンクの無菌で閉じたバイオリアクター内で、PDX1を発現する細胞の集団からのインスリン発現細胞の形成を実証する。インスリン陽性細胞を、ステージ3の間に3つの条件のうちの1つにさらされた細胞から生成した。3つの条件：リアクターB - ステージ3を通じてpH7.0(レチノイン酸で処理)、リアクターC - ステージ3の第1日目にpH7.4、次いでステージ3の2及び3日目にpH7.0、又はリアクターD - ステージ3を通じてpH7.4。ステージ3にてpH7.0に長く曝露することは分化プロセスの後半で、Ki67を低減し、NEUROD1、NKX6.1と共陽性であるNEUROD1、PAX6、Islet1、及びPDX1/NKX6.1といったタンパク質の発現を増加させたことが観察された。

50

【0154】

ヒト胚幹細胞株 H1 (WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin)) の細胞を、動的懸濁液の状態の、0.5% w/v 脂肪酸フリーウシ血清アルブミンを補充した Essential 8 (商標) 培地で、丸い凝集集団として 4 の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び 2 ~ 10 細胞の集団として凍結した。凝集集団内の約 600,000,000,000 ~ 1,000,000,000 細胞を、遠心管に移し、100 mL の 1X DPSS-/- を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットに StemPro (登録商標) Accutase (登録商標) 酵素を 50 体積%、及び DPBS-/- を 50 体積% の溶液 30 mL を添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで 1 ~ 3 度上下させてから、断続的に室温で約 4 分間回転させ、その後 80 ~ 200 rcf で 5 分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase (登録商標) の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約 4 分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び 2 ~ 10 細胞からなる集団にほぐした。4 分後、細胞を、10 µM の Y-27632 及び 0.5% w/v の FAF-BSA を補充した 100 mL の E8 (商標) 培地に再懸濁させ、80 ~ 200 rcf で 5 ~ 12 分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mL あたり 100,000,000 ~ 150,000,000 細胞の最終濃度を得るために冷たい (4) Cryostor (登録商標) Cell Preservation Media CS10 を滴加した。この細胞溶液を、2 mL の極低温バイアル (Corning) に小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレート CryoMed (商標) 34 L フリーザーを使用して細胞を凍結した。チャンバを 4 に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が 6 に達するまで保持し、次に試料が -7 に達するまでチャンバの温度を毎分 2 下げ、その時点でチャンバが -45 に達するまでチャンバを 20 /分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が -25 に達するまで 10 /分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが -40 に達するまで 0.8 /分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが -100 に達するまで 10 /分で冷却し、その時点で、次にチャンバが -160 に達するまでチャンバを 35 /分冷却した。チャンバの温度を、次に -160 で少なくとも 10 分間保持し、その後バイアルをガス相液体室素保存庫に移動した。これらの高濃度で凍結保存した単一細胞を ISM として次に使用した。

【0155】

ISM のバイアルを液体室素保管庫から取り出し、解凍し、3 リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター (DASGIP) に mL あたり 295,000 生細胞の播種濃度で播種するために使用した。バイアルを液体室素保管庫から取り出し、37 の水浴に 120 秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、BSC に移動させ、解凍された内容物を、2 mL ガラスピペットを介して 50 mL 円錐管に移した。次に、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 µM の Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 を補充した 10 mL の E8 (商標) 培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80 ~ 200 rcf で 5 分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 µM の Y-27632 を補充した 10 mL の新鮮な E8 (商標) 培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 µM の Y-27632 を補充した 450 mL の E8 (商標) 培地を収容する培地移動ボトル (Cap2V8 (登録商標)) 内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌 C-Flex (登録商標) チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリアクター内に直接ポンプで注入した。37 に予熱し、70 rpm で攪拌した、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 µM の Y-27632 を補充した 1000 mL の E8 (商標) 培地で、30% の溶存酸素設定値 (調節された空気、O₂、及び N₂)、及び 5% の制御された CO₂ 分圧によって、バイオリアクターを調製した。0.225 × 10⁶ 細胞/mL (濃度範囲: 0.2 ~ 0.5 × 10⁶ 細胞/mL) の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

【 0 1 5 6 】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5% w/vのFAF-BSAを補充した1.5LのE8(商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、使用済みE8(商標)培地を取り除き、分化培地を追加することによって3リットルリアクター内の分化が開始された。分化プロトコルを以下に説明する。

【 0 1 5 7 】

ステージ1(3日間) :

リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを10%の溶存酸素設定値(調節された空気、酸素、及び窒素)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。基本培地を、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5mMグルコース(45%水溶液); 及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地を使用して調製した。細胞を、100ng/mLのGDF8及び3µMのMCX化合物を補充した1.5Lの基本培地で1日間培養した。24時間後、培地交換を上述のように完了し、100ng/mLのGDF8を補充した新鮮な1.5Lの基本培地をリアクターに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。

10

20

【 0 1 5 8 】

ステージ2(3日間) :

リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、酸素、及び窒素)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。基本培地を、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有し、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5mMグルコース; 及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、1.5LのMCDB-131培地を使用して調製した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した1.5Lのステージ2基本培地と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した1.5Lの新鮮なステージ2基本培地と置換した。

30

【 0 1 5 9 】

ステージ3(3日間) :

ステージ2の完了時、かつ培地交換の直前に、無菌溶接及び蠕動ポンプを介して、3リットルリアクターから全ての細胞を取り出した。細胞を、カウントし、重力沈降させ、2,000,000細胞/mLの正常に戻した分布状態で以下のステージ3培地に再懸濁させた。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム; MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5mMグルコース; 及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ3培地に50ng/mLのFGF-7; 100nMのLDN-193189; 2µMのRA; 0.25µMのSANT-1; 及び400nMのTPBを補充した。細胞は、2,000,000細胞/mLの細胞濃度の正常に戻した分布状態で、3つの0.2リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクDASGIP(商標)バイオリアクターB、C、及びD(BxB、BxC、及びBxDとも呼ばれる)の中に無菌溶接及び蠕動ポンプを介して播種された。リアクターを、37の温度に設定し、55rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、酸素、及び窒素)に設定し、ステージ3のpHを表VIIIIに列

40

50

挙されるように3つの異なる培地pH変数に設定した。培地交換24時間後、使用済み培地を、リアクターB～DのそれぞれにおいてLDN-193189を除いて、上記添加剤を含む150mLの新鮮なステージ3培地と再度置換した。細胞をその後、この培地でステージ3の終わりまで48時間培養した。

【0160】

【表10】

表V I I I

	pH設定値 ステージ3、1日目	pH設定値 ステージ3、2日目	pH設定値 ステージ3、3日目	細胞濃度
リアクターB(Bx B)	7.0	7.0	7.0	2.0×10^6 細胞/mL
リアクターC(Bx C)	7.4	7.0	7.0	2.0×10^6 細胞/mL
リアクターD(Bx D)	7.4	7.4	7.4	2.0×10^6 細胞/mL

10

【0161】

ステージ4(3日間)：

ステージ3の完了時、使用済み培地を取り除き、各バイオリアクター内で150mL以下のステージ4培地と置換した。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する150mLのMCDB-131培地。培地に0.25μMのSANT-1及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37℃で維持し、55rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、酸素、及び窒素)に、及びCO₂調節によって7.4のpH設定値に調節した。ステージ4の開始の48時間後、3.2mL/Lの45%グルコース溶液(8mMグルコースポラス)を各バイオリアクターに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。

20

【0162】

ステージ5(7日間)：

ステージ5基本培地を、追加の1.754g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；20mMグルコース；ITS-Xの1:200希釈物；250μL/Lの1Mアスコルビン酸；及び10mg/Lヘパリン(Sigma Aldrich；カタログ番号H3149-100KU)を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する150mLのMCDB-131培地ベースを使用して各バイオリアクター用に調製した。ステージ4の完了後、各バイオリアクター内の使用済み培地を、1μMのT3、10μMのALK5阻害剤II、1μMのセクレターゼ阻害剤XXI；20ng/mLのベータセルリン；0.25μMのSANT-1；及び100nMのRAを補充した、150mLのステージ5培地と置換した。ステージ5の開始の48時間後、使用済み培地を取り除き、同じ新鮮な基本培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を再度交換し、セクレターゼXXI及びSANTが除外されたことを除いて、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を再度交換し、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換し、ステージ5の終わりまで更に24時間細胞を培養した。ステージ5を通して、30%DO及び7.4pHを維持した。

30

40

【0163】

分化プロセスを通じて、pH及びDOについてのリアルタイム連続監視に加えて、培地サンプルを毎日リアクターから収集した。サンプルを、細胞数、mRNA発現、及びタンパク質発現について解析した。

【0164】

図24A及びBは、ステージ3、4及び5の過程でリアクターB、C、及びDの培地に

50

おける pH (図 2 4 A) 及び溶存酸素濃度 (図 2 4 B) の連続監視グラフを示す。これらのデータは、ステージ 3 を通じて pH 7.0 に設定されたリアクター B 内の細胞は、リアクター C 及び D と比較してより低い濃度の溶存酸素によって測定されるように、ステージ 4 及び 5 で酸素消費の増加を示したことを実証する (図 2 4 B)。更に、リアクター B、C、及び D 内の細胞濃度は、ステージ 5 を通じて同程度であった (図 2 5 及び表 V I I I) ので、酸素消費の差は、細胞密度の有意差のためではなかった。これは、ステージ 3 の間 pH 7.0 で処理されたリアクター B 内の細胞が、ステージ 4 の終わりまでにリアクター C 又は D からの細胞 (ステージ 3 の間 pH 7.4 にそれぞれ 1 又は 3 日間曝露された) より成熟した、かつ酸素を消費する表現型を取り始めたことを示唆する。

【 0 1 6 5 】

ステージ 3 の完了時、及び 3 日後のステージ 4 の終わりに再び、リアクターのそれぞれからのサンプルをフローサイトメトリーによってタンパク質発現について分析した。NKX 6.1、NEUROD 1、PDX 1、及び CDX 2 の発現を実証するデータは、表 I X に示される。ステージ 3 を通じて、又はステージ 3 の最後の 2 日間 pH 7.0 で維持された細胞 (それぞれリアクター B 及び C) が、リアクター D (ステージ 3 を通じて 7.4 の pH に設定された) 内で維持された細胞と比較したとき、ステージ 4 の終わりに比例的に多くの NKX 6.1 陽性細胞及び少ない NEUROD 1 陽性細胞を有したことが、細胞内フローサイトメトリーによって観察された。これらのデータは、ステージ 3 における pH 7.0 への部分的な曝露であっても NEUROD 1 発現を抑制するのに十分であることを示す。

【 0 1 6 6 】

フローサイトメトリーによって細胞タンパク質発現を判定することに加えて、出願者らは、分化プロセスのステージ 3 及び 4 を通じてサンプルを、Open Array (登録商標) qRT-PCR を使用して遺伝子パネルの mRNA 発現について試験した。図 2 6 A ~ N は、分化させてからステージ 5 の第 1 日目までヒト胚性幹細胞株 H 1 の細胞における以下の遺伝子のリアルタイム PCR 解析のデータを示す。PDX 1 (図 2 6 A)、NKX 6.1 (図 2 6 B)、PAX 4 (図 2 6 C)、PAX 6 (図 2 6 D)、NeuroG3 (NGN 3) (図 2 6 E)、ABCC 8 (図 2 6 F)、クロモグラニン - A (図 2 6 G)、クロモグラニン - B (図 2 6 H)、ARX (図 2 6 I)、グレリン (図 2 6 J)、IAPP (図 2 6 K)、PTF 1 a (図 2 6 L)、NEUROD 1 (図 2 6 M)、及び NKX 2.2 (図 2 6 N)。

【 0 1 6 7 】

図 2 6 A に示されるように、低いステージ 3 の pH (7.0) 又は標準のステージ 3 の pH (7.4) の両方の分化条件下で、細胞は、ステージ 3 で膵臓運命をとる細胞を示す類似のレベルの PDX 1 を発現した。しかしながら、リアクター B 及び C (pH 7.0 曝露) からの細胞がステージ 4 に入ったとき、PDX 発現は、一貫して pH 7.4 で維持された細胞 (リアクター D) と比較して増加した。PDX 発現におけるこの増加は、NKX 6.1 発現における誘導と一致した (図 2 6 B)。興味深いことに、ステージ 3 及び 4 におけるリアクター D からの細胞は、早期の膵内分泌細胞の発達に必要なかつ特徴的な複数の遺伝子を発現し始めた。図 2 6 C、2 6 D、2 6 E、2 6 M、2 6 N、2 6 I、2 6 J、2 6 G、及び 2 6 H に示されるように PAX 4、PAX 6、NGN 3、NEUROD 1、NKX 2.2、ARX、グレリン、CHGA、及び CHGB。相対的に低い NKX 6.1 の発現と組み合わせたこの遺伝子発現のパターンは、リアクター B 及び C と比較して、リアクター D において増加した早期の (非細胞) 膵内分泌腺の特異化を示した。

【 0 1 6 8 】

対照的に、リアクター B 及び C からの細胞は、qRT-PCR で測定すると、ステージ 3 において、リアクター D と比較して著しく低い濃度の、早期の膵内分泌腺発達に特徴的な転写因子 (PAX 4、PAX 6、NGN 3、NEUROD 1、NKX 2.2、及び ARX) を発現した (図 2 6 C、2 6 D、2 6 E、2 6 M、2 6 N、及び 2 6 I)。更に、出願者らは、リアクター B 及び C からの細胞は、ステージ 4 の 1 日目に細胞形成に必要な転

10

20

30

40

50

写因子のNKX6.1メッセージが増加し(図26B)、その後ステージ4の2日目にPAX6、NEUROD1、及びNKX2.2のmRNA発現が増加した(図26D、26M、及び26N)ことを観察した。これらのOpenArray(登録商標)qRT-PCRデータは、ステージ3にて7.0pHで2又は3日間維持された細胞が、ステージ3及び4の終わりにNEUROD1を発現しにくく、NKX6.1を発現しやすかったことを実証したフローサイトメトリー結果に相関した(表XI)。これらの結果は、ステージ3の全ての間又は一部の間であっても低pH(7.0)への曝露が早期の(非細胞)膵内分泌腺の特異化を阻害し、細胞を形成するのに必要な転写因子発現シーケンスを活性化したことを示す。

【0169】

遺伝子の発現の遅延又は低下の効果は、非細胞膵内分泌腺の特異化に参与し、ステージ3で減少した培地pHを通じ、分化のステージ5の終わりまで持続した。リアクターB(ステージ3の全てでpH7.0)で分化された細胞は、NKX6.1/インスリン共陽性細胞(17.9%、条件B、対14%、条件D)での増加と共に、リアクターD細胞(19.5%、表XIV)と比較するとインスリン陽性細胞の割合(25.4%、表XIV)が増加した。これらの結果は、リアクターDの44.9%PAX6及び24.7%Islet1陽性細胞と比較して、リアクターBが53.8%PAX6及び31%islet1陽性細胞を産生したように、PAX6及びIslet1発現などの適切な内分泌島の形成に必要なマーカーの増加に反映された(表XIV)。増殖の尺度であるKi67発現もまた、リアクターDからの細胞と比較すると、ステージ3にてpH7.0で処理された細胞において減少したが(表XIV)、これは成長中かつ分化の程度が少ない集団から、より最終分化した組織への遷移を示す。

【0170】

興味深いことに、ステージ3における低pHは、早期の内分泌腺分化を抑制したが、リアクターB及びCからの細胞は、ステージ4及び5において汎膵転写因子、PDX1の高発現を保持した。更に、リアクターB及びC細胞は、リアクターDと比較してステージ3及び4において低いNEUROD1発現(汎内分泌系転写因子)を有したが(表XI)、これらはステージ5の終わりまでに、より高い割合のNEUROD1及びNEUROD1/NKX6.1共陽性細胞(表X)を示した。これらの結果は、ステージ3における低pHが、早い段階での内分泌腺運命への初期分化を抑制したこと、その後適切な細胞特異化に必要な転写因子の共発現の増加を促進したこと、並びにステージ5の終わりまでに島組織及び細胞に特徴的なマーカー及び転写因子の全体の発現を増加させたことを示す。

【0171】

10

20

30

【表 1 1】

表 I X-フローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

	状態	生細胞濃度 (10 ⁶ 細胞/mL)	NKX6. 1	PDX1	NEUROD1	
S3D3-24H (9日目)	BX B	0. 767	14. 2	99. 6	1. 9	
	BX C	0. 818	16. 1	99. 3	2. 6	
	BX D	0. 761	21. 4	99. 4	10. 8	
	状態	生細胞濃度 (10 ⁶ 細胞/mL)	NKX6. 1	PDX1	NEUROD1	CDX2
S4D3-24H (12日目)	BX B	0. 551	82. 1	98. 1	15. 8	0. 6
	BX C	0. 569	85. 9	99. 7	10. 3	0. 1
	BX D	0. 4	71. 9	98. 5	22. 4	4. 7

10

【 0 1 7 2】

【表 1 2】

表 X-ステージ5のフローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

	NKX6. 1	(PDX1+)/ NKX6. 1+/ PDX1+	(INS+) NKX6. 1+/ INS+	PAX6	ISLET1	CDX2	(NEUROD1+)/ NKX6. 1+/ NEUROD1+	Ki67
BX B	57. 5	(87. 7)72. 8	(25. 4)17. 9	53. 8	31	2. 3	(56. 7)45. 7	17
BX C	72. 3	(86. 4)72. 7	(21. 9)16. 3	50. 1	25. 4	2. 1	(50. 3)42. 5	22. 7
BX D	66. 4	(89. 6)67. 4	(19. 5)14	44. 9	24. 7	0. 8	(46. 1)35. 6	30

20

30

【 0 1 7 3】

(実施例 4)

この実施例は、3リットル攪拌タンクの無菌で閉じたバイオリアクター内で、PDX1を発現する細胞の集団からのインスリン発現細胞の形成を実証する。インスリン陽性細胞は、PDX1発現を保持し、NKX6. 1を共発現したこのプロセスから生成された。ステージ5の終わりに、インスリン陽性細胞を55RPMで攪拌される500mLスピナーフラスコに移し、ステージ6の間高グルコース(25. 5mM)又は低グルコース(5. 5mM)を含有する培地のどちらかで、5%CO2加湿37インキュベータに保持した。ステージ6でどちらのグルコース濃度を使用する細胞も大半は、PDX1、NKX6. 1又はNEUROD1陽性であり、リアクター内の全ての細胞のほぼ半分は、NKX6. 1/PDX1/インスリン共陽性であった。

40

【 0 1 7 4】

ヒト胚幹細胞株H1(WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin))の細胞を、動的懸濁液の状態の、0. 5%w/vのFAF-BSAを補充したE8(商標)培地で、丸い凝集集団として4の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び2~10細胞の集団として凍結した。集団内の約600, 000, 000~1, 000, 000, 000の凝集細胞を、遠心管に移し、100mLの1X DPSS-/ -を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットにStemPro(登録商標)Accu

50

t a s e (登録商標) 酵素を50体積%、及びDPBS - / - を50体積%の溶液30 mLを添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで1~3度上下させてから、断続的に室温で約4分間巡回させ、その後80~200 r c fで5分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、A c c u t a s e (登録商標)の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約4分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び2~10細胞からなる集団にほぐした。4分後、細胞を、10 μ MのY - 27632及び0.5% w / vのFAF - BSAを補充した100 mLのE8 (商標)培地に再懸濁させ、80~200 r c fで5~12分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mLあたり100,000,000~150,000,000細胞の最終濃度を得るために冷たい(4) Cryostor (登録商標) Cell Preservation Media CS10を滴加した。この細胞溶液を、2 mLの極低温バイアルに小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレートフリーザーCryoMed (商標) 34L Controlled - Rate Freezerを使用して細胞を凍結した。チャンバを4 に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が6 に達するまで保持し、次に試料が-7 に達するまでチャンバの温度を毎分2 下げ、その時点でチャンバが-45 に達するまでチャンバを20 /分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が-25 に達するまで10 /分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが-40 に達するまで0.8 /分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが-100 に達するまで10 /分で冷却し、その時点で、次にチャンバが-160 に達するまでチャンバを35 /分冷却した。チャンバの温度を、次に-160 で少なくとも10分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保存庫に移動した。これらの高密度で凍結保存した単一細胞をISMとして次に使用した。

【0175】

ISMのバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター(DASGIP)にmLあたり295,000生細胞の播種濃度で播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、37 の水浴に120秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、BSCに移動させ、解凍された内容物を、2 mLガラスピペットを介して50 mL円錐管に移した。次に、0.5% w / vのFAF - BSA及び10 μ MのRhoキナーゼ阻害剤Y - 27632を補充した10 mLのE8 (商標)培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80~200 r c fで5分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5% w / vのFAF - BSA及び10 μ MのY - 27632を補充した10 mLの新鮮なE8 (商標)培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5% w / vのFAF - BSA及び10 μ MのY - 27632を補充した450 mLのE8 (商標)培地を収容するCap2V8 (登録商標)培地移動ボトル内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌C - Flex (登録商標)チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリアクター内に直接ポンプで注入した。37 に予熱し、70 r p mで攪拌した、0.5% w / vのFAF - BSA及び10 μ MのY - 27632を補充した1000 mLのE8 (商標)培地で、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)、及び5%の制御されたCO₂分圧によって、バイオリアクターを調製した。0.225 \times 10⁶細胞/mL(濃度範囲:0.2~0.5 \times 10⁶細胞/mL)の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

【0176】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5% w / vのFAF - BSAを補充した1.5 LのE8 (商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、集団を沈降させるために羽根車及び電熱ジャケットを5~20分間停止し、培地を取り除き、閉鎖システムを維持するためにTerumo (商標)チューブウェルダールを使用してC - Flex (登録商標)チュービングに結合された

浸漬管を通して蠕動ポンプによって置換した。羽根車を浸らせるのに十分な培地を添加した後で、電熱ジャケットに再び電圧を加えた。分化プロトコルを以下に説明する。

【0177】

ステージ1（3日間）：

ステージ1基本培地を、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有し、追加の3.6g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された100mLの2%w/vのFAF-BSA；10mLの1X濃度のGlutaMAX（商標）；1mLの2.5mMグルコース（45%水溶液）；及びITS-Xの1：50，000希釈物を補充した、900mLのMCDB-131培地を使用して調製した。細胞を、100ng/mLのGDF8及び3μMのMCX化合物を補充した基本培地で1日間培養した。24時間後、培地交換を上述のように完了し、100ng/mLのGDF8を補充した新鮮な基本培地をフラスコに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。ステージ1を通して、溶存酸素含量を10%で、かつpHを7.4で維持した。

10

【0178】

ステージ2（3日間）：

ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、ステージ1の基本培地（ただし50ng/mLのFGF7を補充した）と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した新鮮な基本培地と置換した。ステージ2を通して、DOを30%DOで、かつpHを7.4で維持した。

20

【0179】

ステージ3（3日間）：

ステージ2の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ2培地を取り除き、以下の基本培地と置換した。1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有し、追加の3.6g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された100mLの2%w/vのFAF-BSA；10mLの1X濃度のGlutaMAX（商標）；1mLの2.5mMグルコース（45%水溶液）；及びITS-Xの1：200希釈物を補充した、900mLのMCDB-131培地。ステージ3基本培地に50ng/mLのFGF-7；100nMのLDN-193189；2μMのRA；0.25μMのSANT-1；及び400nMのTPBを補充した。培地交換24時間後、使用済み培地を、LDN-193189を除いて、上記添加剤を含む新鮮な培地と再度置換した。その培地で48時間細胞を培養した。ステージ3を通して、30%DO及び7.0のpHを維持した。

30

【0180】

ステージ4（3日間）：

ステージ3の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ3培地を取り除き、ステージ3で使用されるのと同じ基本培地（ただし0.25μMのSANT-1及び400nMのTPBを補充した）と置換した。ステージ4の開始の48時間後、3.2mL/Lの45%グルコース溶液（8mMグルコースブーラス）を各バイオリアクターに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。ステージ4を通して、30%DO及び7.4のpHを維持した。

40

【0181】

ステージ5（7日間）：

ステージ4の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ4培地を取り除き、以下のステージ5基本培地と置換した。追加の1.754g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された100mLの2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX（商標）；8mL/Lの45%グルコース溶液；ITS-Xの1：200希釈物；250μL/Lの1Mアスコルビン酸；及び1mLの10mg/Lヘパリン溶液を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する900mLのMCDB-131培地ベース。ステージ5基本培地に1μMのT3、10μMのAL

50

K5阻害剤II、1 μ Mのセクレターゼ阻害剤XXI；20 ng/mLのベータセルリン；0.25 μ MのSANT-1；及び100 nMのRAを補充した。ステージ5の開始の48時間後、使用済み培地を取り除き、同じ新鮮な基本培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を再度交換し、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を再度交換し、セクレターゼ阻害剤XXI及びSANTが除外されたことを除いて、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換した。48時間後、使用済み培地を取り除き、同じ新鮮な培地及び添加剤と置換した。細胞をステージ5の終わりまで更に24時間培養した。ステージ5を通して、30% DO及びpH 7.4を維持した。

【0182】

ステージ6（7日間）：

ステージ5の終わりに（分化の19日目）、細胞を無菌溶接及び蠕動ポンプを介して3リットルリアクターから取り出した。次に細胞をカウントし、重力沈降させ、500,000細胞/mLの正常に戻した分布状態でステージ6培地（以下に詳述される）に再懸濁させ、55RPMで攪拌される2つの0.5リットル使い捨てスピナーフラスコ（Corning）に追加し、高グルコース（25.5 mM）又は低グルコース（5.5 mM）を含有する培地のどちらかで、5% CO₂加湿37インキュベータにドリフト条件下で7日間維持した。1つのフラスコは、以下の培地及び添加剤を含有した。追加の1.754 g/L重炭酸ナトリウム；MCD B-131に予め再構成された100 mLの2% w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX（商標）；8 mL/Lの45%グルコース溶液（25.5 mMの最終グルコース濃度）；ITS-Xの1：200希釈物；250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸；及び1 mLの10 mg/Lヘパリン；及び10 μ MのALK5阻害剤IIを補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する300 mLのMCD B-131培地ベース。第2のフラスコは、以下の培地及び添加剤を含有した。追加の1.754 g/L重炭酸ナトリウム；MCD B-131に予め再構成された100 mLの2% w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX（商標）；ITS-Xの1：200希釈物；250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸；及び1 mLの10 mg/Lヘパリン；及び10 μ MのALK5阻害剤IIを補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウム及び5.5 mMの基礎グルコース濃度を含有する300 mLのMCD B-131培地ベース。ステージ5の開始の48時間、96時間、及び120時間後、使用済み培地を取り除き、同じ新鮮な基本培地及び添加剤と置換した。ステージ6を、開始から144時間後に終了した（分化26日目）。

【0183】

分化プロセスを通じて、サンプルをリアクターから収集し、表Xに示されるように全細胞数、及び図27に示されるようにmRNA発現（Open Array（登録商標）qRT-PCR）について解析した。ステージ3、4、5、及び6の終わりに、サンプルを、フローサイトメトリー（表XII）を使用してタンパク質発現について分析した。

【0184】

ステージ3の完了時、ほとんど全ての細胞が内胚葉転写因子（FOXA2）及び膵特異的転写因子（PDX1）の両方を発現したことが観察された。フローサイトメトリーによって、NKX6.1（~20%）を発現した少数の細胞が検出され、NEUROD1発現細胞はほとんど検出されなかった（表XII）。ステージ4の終わりに、サンプルを、フローサイトメトリーによってNKX6.1、NEUROD1、PDX1、FOXA2、CDX2、及びKi67の発現について再度解析した（表XII）。興味深いことに、ステージ3の終わりからステージ4の終わりまで、NKX6.1発現集団は、細胞の91%を超えるまで増加し、これらの細胞は、内胚葉及び膵臓の特異化を保持した（PDX1及びFOXA2発現細胞が>99%）。しかしながら、細胞の限定された集団（<8%）だけが、内分泌ホルモン細胞に特徴的なマーカー（Islet1、CHGA、NEUROD1、及びNKX2.2）を発現した。ステージ5の完了時に、内分泌ホルモン細胞に特徴的なマーカーに対して陽性である細胞の割合は実質的に増加し、ステージ4の終わりの10%未満から、NEUROD1に対して陽性である細胞76%及びインスリンに対して陽性

10

20

30

40

50

57%まで上がった。更に、細胞の全集団は、大部分がNKX6.1(81%)及びPDX1(>97%)発現をし続けた。Ki67に対して陽性である細胞の割合によって測定される増殖のレベルは、約18%であり、内胚葉系腸細胞に対するマーカー、CDX2は、<3.0%で非常に低かった。これらのデータは、島様の、及び特に細胞様の集団が、リアクター内で生じていたことを示す。

【0185】

ステージ5の完了時に、細胞を3リットルの攪拌タンクリアクターから取り出し、5%CO₂、37℃、加湿インキュベータに維持された500mLスピナーフラスコに分割した。スピナーフラスコを、基本培地のグルコース濃度を除いて同様の条件下で処理した。試験された2つのグルコース条件は以下のとおりであった。低グルコース - 5.5mM初期基礎グルコース濃度(「LG」)、又は高グルコース - 25.5mM初期基礎グルコース濃度(「HG」)(表XIV)。どの条件においても7日間ステージ6で処理した細胞は、内分泌ホルモン細胞、及び特に膵島細胞に特徴的なマーカーにおいてほぼ増加を示した。ステージ6の7日目の終わりに、細胞のほぼ半分は、PAX6に対して陽性であり、更に60%は、NEUROD1 & NKX6.1、又はインスリン & NKX6.1に対して共陽性であった(表XIII)。加えて、この系で生成された細胞は、高濃度のPDX1(>81%)を保持し、Ki67に対して陽性である細胞の割合によって測定される増殖のレベルの減少を実証した(表XIVで約12%)。

10

【0186】

これらの結果は、細胞がステージ5に入ると、劇的かつ一過性のNGN3の誘導があることを示すOpen Array(登録商標)qRT-PCRデータによって支持された(図27A)。この後に、NEUROD1発現(図27B)、並びにそれぞれ図27C~Jに示されるクロモグラニンA(CHGA)、クロモグラニンB(CHGB)、グルカゴン(GCG)、島関連ポリペプチド(IAPP)、Islet1(ISL1)、MAFB、PAX6、及びソマトスタチン(SST)などの島形成及び内分泌ホルモン細胞に関連する他の遺伝子での持続的誘導が続く。島特異的遺伝子の誘導に加えて、NKX6.1、NKX2.2、MNX1/HB9、及びUCN3(それぞれ図27P~S)などの細胞の形成及び機能に必要な転写因子と同様に、インスリン(INS;図27K)、グルコース6ホスファターゼ2(G6PC2;図27L)、PCSK1及び2(図27M及びN)、亜鉛輸送体(SLC30A8;図27O)で観察されるように、細胞特異的遺伝子もまたステージ5で誘導され、ステージ6に至るまで持続された。他に取り得る運命の形成を示すCDX2及びZIC1などの遺伝子の発現は、qRT-PCRによる検出の限界に近いが又は限界を下回った(データは示さず)。

20

30

【0187】

【表 1 3】

表 X I ; 分化の特定の日の全細胞カウント

分化日数	全細胞 ($\times 10^6 / \text{mL}$)
-3	0.23
0-事前調整	0.75
0- $0.5 \times 10^6 / \text{mL}$ 調整	0.50
4	1.49
6-事前調整	1.61
6- $2M / \text{mL}$ 調整	2.15
7	2.21
11	1.47
12	1.24
13	0.68
19	0.57

10

【0188】

20

【表 1 4】

表 X I I ; ステージ3の終わり (S3D3-24H) 及びステージ4の終わり (S4D3-24H) のフローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

	生細胞濃度 (10^6 細胞/mL)	NKX6.1	CHGA	NKX2.2	PDX1	FOXA2	NEUROD1	ISLET1
S3D3-24H	1.14	21	1.6	非適用	99.6	99.9	4	非適用
S4D3-24H	1.24	91.7	5.2	7.2	99.8	99.4	7.2	2.8

30

【0189】

【表 1 5】

表 X I I I - ステージ5の終わり (S5D7-24H) のフローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の%)

生細胞濃度 (10^6 細胞/mL)	NKX6.1	PDX1	(NEUROD1+) NKX6.1+/ NEUROD1+	(INS+) NKX6.1+/ INS+	ISLET1	Ki67	CDX2
0.42	81.1	97.6	(76.3)60.5	(56)45.7	36.8	18.5	2.6

40

【0190】

【表 16】

表 X I V : ステージ 6 の終わり (S 6 D 7 - 2 4 H) のフローサイトメトリー結果 (マーカー陽性の細胞の %)
(注記 : L G = 5 . 5 m M グルコース ; H G = 2 5 . 5 m M グルコース)

	NKX6. 1	PDX1	(NEUROD1+) NKX6. 1+ / NEUROD1+	(C-pep+) NKX6. 1+ / C-pep+	(INS+) NKX6. 1+ / INS+	(C-pep+) C-pep+ / INS+	(CHGA+) / NKX6. 1+ / CHGA+	Ki67	PAX6
LG	87	81. 2	(71. 1)61. 1	(43. 4)38. 4	(72. 6)64. 8	(41)37. 7	(56. 7)48	12	51. 3
HG	83. 8	86. 7	(69. 1)60. 5	(46. 9)38. 6	(71. 5)61. 9	(47. 4)42. 1	(66. 1)53. 8	11. 6	46. 7

【 0 1 9 1 】

(実施例 5)

この実施例は、攪拌タンクの無菌で閉じたバイオリアクター内で、転写因子、PDX1 を発現する細胞の集団からのインスリン発現細胞の形成を実証する。このプロセスから生成されたインスリン陽性細胞は、PDX1 発現を保持し、NKX6. 1 を共発現した。この細胞の集団を、免疫力が低下したマウスの腎臓被膜の中に移植したとき、生着の 4 週間以内にヒト C ペプチドの検出可能血中濃度を産生した。

【 0 1 9 2 】

ヒト胚幹細胞株 H 1 (W A 0 1 c e l l s , W i C e l l R e s e a r c h I n s t i t u t e (M a d i s o n , W i s c o n s i n)) の細胞を、動的懸濁液の状態の、0. 5 % w / v の F A F - B S A を補充した E 8 (商標) 培地で、丸い凝集集団として 4 の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び 2 ~ 10 細胞の集団として凍結した。集団内の約 600, 000, 000 ~ 1, 000, 000, 000 の凝集細胞を、遠心管に移し、100 mL の 1 X D P S - / - を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットに StemPro (登録商標) Accutase (登録商標) 酵素を 50 体積 %、及び D P B S - / - を 50 体積 % の溶液 30 mL を添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで 1 ~ 3 度上下させてから、断続的に室温で約 4 分間巡回させ、その後 80 ~ 200 r c f で 5 分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase (登録商標) の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約 4 分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び 2 ~ 10 細胞からなる集団にほぐした。4 分後、細胞を、10 μ M の Y - 2 7 6 3 2 (E n z o L i f e S c i e n c e s) 及び 0. 5 % w / v の F A F - B S A を補充した 100 mL の E 8 (商標) 培地に再懸濁させ、80 ~ 200 r c f で 5 ~ 12 分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mL あたり 100, 000, 000 ~ 150, 000, 000 細胞の最終濃度を得るために冷たい (4) C r y o s t o r (登録商標) C e l l P r e s e r v a t i o n M e d i a C S 10 を滴加した。この細胞溶液を、2 mL の極低温バイアル (C o r n i n g) に小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレート CryoMed (商標) 3 4 L フリーザーを使用して細胞を凍結した。チャンバを 4 に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が 6 に達するまで保持し、次に試料が - 7 に達するまでチャンバの温度を毎分 2 下げ、その時点でチャンバが - 4 5 に達するまでチャンバを 20 / 分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が - 2 5 に達するまで 10 / 分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが - 4 0 に達するまで 0. 8 / 分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが - 1 0 0 に達するまで 10 / 分で冷却し、その時点で、次にチャンバが - 1 6 0 に達するまでチャンバを 3 5 / 分冷却した。チャンバの温度を、次に - 1 6 0 で少なくとも 10 分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保存庫に移動した。これらの高密度で凍結保存した単一細胞を I S M として次に使用した。

【 0 1 9 3 】

I S M のバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3 リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター (D A S G I P) に mL あたり 2 9 5 , 0 0 0 生細胞の播

10

20

30

40

50

種濃度で播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、37℃の水浴に120秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、BSCに移動させ、解凍された内容物を、2mLガラスピペットを介して50mL円錐管に移した。次に、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのRhokinase阻害剤Y-27632を補充した10mLのE8(商標)培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80~200rcfで5分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した10mLの新鮮なE8(商標)培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した450mLのE8(商標)培地を収容する培地移動ボトル(Cap2V8(登録商標), Sanisure, Inc)内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌C-Flux(登録商標)チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリクター内に直接ポンプで注入した。37℃に予熱し、70rpmで攪拌した、0.5%w/vのFAF-BSA及び10μMのY-27632を補充した1000mLのE8(商標)培地で、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)、及び5%の制御されたCO₂分圧によって、バイオリクターを調製した。0.225×10⁶細胞/mL(濃度範囲:0.2~0.5×10⁶細胞/mL)の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

10

【0194】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5%w/vのFAF-BSAを補充した1.5LのE8(商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、使用済みE8(商標)培地を取り除き、分化培地を追加することによって3リットルリアクター内の分化が開始された。分化プロトコルを以下に説明する。

20

【0195】

ステージ1(3日間):

リアクターを、37℃の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを10%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。ステージ1基本培地を、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5mMグルコース(45%水溶液); 及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地を使用して調製した。細胞を、100ng/mLのGDF8及び3μMのMCX化合物を補充した1.5Lの基本培地で1日間培養した。24時間後、培地交換を上述のように完了し、100ng/mLのGDF8を補充した新鮮な1.5Lの基本培地をリアクターに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。

30

【0196】

ステージ2(3日間):

リアクターを、37℃の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、1.5Lの同じ培地(ただし50ng/mLのFGF7を補充した)と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した300mLの新鮮なステージ2基本培地と置換した。

40

【0197】

ステージ3(3日間):

ステージ2の完了時、かつ培地交換の直前に、細胞を、カウントし、重力沈降させ、1

50

5リットル中に2,000,000細胞/mLの正常に戻した分布状態で以下のステージ3基本培地に再懸濁させた。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム;MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA;1X濃度のGlutaMAX(商標);2.5mMグルコース;及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ3基本培地に50ng/mLのFGF-7;100nMのLDN-193189;2μMのRA;0.25μMのSANT-1;及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に、及びCO₂調節により7.0pHに設定した。培地交換24時間後、使用済み培地を、LDN-193189を除いて、上記添加剤を含む1.5Lの新鮮なステージ3培地と再度置換した。細胞をその後、この培地でステージ3の終わりまで48時間培養した。

10

【0198】

ステージ4(3日間):

ステージ3の完了時、使用済み培地を取り除き、各バイオリアクター内で以下からなる1.5Lのステージ4基本培地と置換した。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム;MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA;1X濃度のGlutaMAX(商標);2.5mMグルコース;及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ4基本培地に0.25μMのSANT-1及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37で維持し、70rpmで攪拌した。気体及びpHを、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に、及びCO₂調節により7.4のpH設定値に調節した。ステージ4の開始の48時間後、3.2mL/Lの45%グルコース溶液(8mMグルコースポラス)をバイオリアクターに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。

20

【0199】

ステージ5及び6:

ステージ4の3日目の終わりに、丸い凝集集団をバイオリアクターから汲み出し、55RPMで攪拌される2つの別個の0.5リットルのCorning使い捨てスピナーフラスコに移し、5%CO₂を補充した37加湿インキュベータ内で維持した。その後、各容器内の細胞を、以下からなる300mLの作業体積のステージ5基本培地で維持した。追加の1.75g/L重炭酸ナトリウム;MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA;1X濃度のGlutaMAX(商標);20mMグルコース;ITS-Xの1:200希釈物;250μL/Lの1Mアスコルビン酸;10mg/Lヘパリン;3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として1μMのT3、及び10μMのALK5阻害剤IIを補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する300mLのMCDB-131培地。

30

【0200】

使用されるステージ5基本培地を、以下のような2つの異なる条件A又はBに従って補充した。

40

a.条件Aについては、100nMのLDN、100nMのSANT、及び10μMの硫酸亜鉛を補充したステージ5+基本培地を利用することによってステージ5を開始した。この培地を、ステージを開始して24及び48時間後に交換した。ステージ5を開始して72時間後に、使用済み培地を取り除き、100nMのXXセクレターゼ阻害剤、100nMのLDN、及び10μMの硫酸亜鉛を補充したステージ5基本培地で細胞を処理することによって、ステージ6を開始した。この培地をその後、8、9、及び11日目の開始時を除き11日間24時間ごとに置換した。

b.条件Bについては、100nMのセクレターゼ阻害剤、XX;20ng/mLのベータセルリン;0.25μMのSANT-1;及び100nMのRAを補充したステージ5基本培地を利用することによってステージ5を開始した。ステージ5の開始の48時

50

間後、使用済み培地を取り除き、300 mLの同じ培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を取り除き、20 ng/mLのベータセルリン、及び100 nMのRAを補充したステージ5基本培地と置換した。48時間後、培地を再度交換し、同じ培地と置換した。

【0201】

分化プロセスを通じて、解析のために懸濁培養から細胞サンプルを収集した。サンプルを、mRNA発現(Open Array(登録商標)qRT-PCR)、及びタンパク質発現(フローサイトメトリー及び蛍光免疫組織化学)について解析した。

【0202】

ステージ4の終わりから6日後(条件A - ステージ6、3日目; 条件B - ステージ5、6日目)、両方の処理からの細胞が、膵内分泌腺及び細胞の形成と一致するフローサイトメトリーによって検出可能なタンパク質の集団を発現した(表XV)ことが観察された。両方の処理が、高い割合のPDX1(>91%)発現細胞を生成し、細胞は、インスリン及びNKX6.1(表示せず)を共発現し始めた。興味深いことに、条件Aに従って処理された細胞は、増殖のレベルが低下したことが観察された。すなわちAでは細胞の15.5%及びBでは27.3%がKi67を発現した(表XV)。更に、条件Aで処理された細胞は、条件Bより多くのNKX6.1発現細胞、NEUROD1発現細胞、及びNKX6.1/NEUROD1共発現細胞を有し(表XV)、条件Aでの処理が、膵内分泌腺に特徴的かつ細胞を形成することができる遺伝子を発現する細胞の、より大きな集団を生成したことを示した。

【0203】

これらのフローサイトメトリーデータは、細胞がステージ5に入ると、NEUROD1発現の持続的誘導(図28B)と相関している両方の条件下でNGN3の誘導(図28A)があったことを示したOpen Array qRT-PCRデータによって支持された。条件Aでは、ステージ5でのNGN3の初期誘導後、セクレターゼ阻害剤、XXでの処理に対応したステージ6の開始時にNGN3の第2の誘導があった。条件Aに関するNGN3発現のこの二重のピークは、NKX6.1の持続的発現と同時に発生し(図28C)、クロモグラニンA(CHGA)、クロモグラニンB(CHGB)、グルカゴン(GCG)、島関連ポリペプチド(IAPP)、MAFB、PAX6、及びソマトスタチン(SST)(それぞれ図28D~J)などの島形成及び内分泌ホルモン細胞と関連する複数の遺伝子の発現と相関した。更に、細胞の形成、成熟、及び機能に必要なMNX1/HB9、及びUCN3転写因子(それぞれ図28O及びP)と同様に、細胞の機能に必要な遺伝子もまた、インスリン(INS; 図28K)、グルコース6ホスファターゼ2(G6PC2; 図28L)、PCSK1(図28M)、及び亜鉛輸送体(SLC30A8; 図28N)について観察されるように、ステージ5で誘導され、ステージ6に至るまで持続された。

【0204】

ステージ6の11日目の終わりに、条件Aからの 5×10^7 分化細胞を、50 mL円錐内の培地から分離し、その後1.18 g/L重炭酸ナトリウム及び0.2% w/vのFAF-BSAを含有するMCDB-1313培地で2回洗浄した。細胞を洗浄(was)培地に再懸濁させ、NSGマウスの腎臓被膜下への移植前に室温にて約5時間保持した。各動物は、 5×10^6 細胞の投与を受けた。移植の前に、これらの細胞は、膵内分泌腺及び細胞と一致するタンパク質を発現した(表XVI)。また最も早く測定した時点、移植4週間後に、及び18週間の実験の過程の間中、夜間絶食及びIPグルコースボラス60分後の眼窩後方採血の後に、腹腔内グルコース注射に応じてヒトCペプチドが検出された(N=7動物、図29)。

【0205】

10

20

30

40

【表 17】

表 XV フローサイトメトリー結果

ステージ4の終わりの6日後（条件A－ステージ6、3日目；
条件B－ステージ5、6日目）

	NKX6.1	PDX1	NEUROD1 (NEUROD1+/NKX6.1+)	Ki67
条件A	67.5	91.9	67.9(45.5)	15.5
条件B	49.4	92.1	44.0(31.5)	27.3

【0206】

10

【表 18】

表 XVI フローサイトメトリー結果

条件A－ステージ6、11日目

	NKX6.1	INS (NKX6.1+/INS+)	NKX2.2	PDX1	Ki67
条件A	90.4	28.9(25.8)	90.3	96.2	5.3

【0207】

（実施例6）

この実施例は、攪拌タンクの無菌で閉じたバイオリアクター内で、PDX1を発現する細胞の集団からのインスリン発現細胞の形成を実証する。このプロセスから生成されたインスリン陽性細胞は、PDX1発現を保持し、NKX6.1を共発現した。この細胞の集団を、免疫力が低下したマウスの腎臓被膜の中に移植したとき、生着の2週間以内にヒトCペプチドの検出可能血中濃度を産生した。

20

【0208】

ヒト胚幹細胞株H1(WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin))の細胞を、動的懸濁液の状態の、0.5% w/vのFAF-BSAを補充したE8(商標)培地で、丸い凝集集団として4の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び2~10細胞の集団として凍結した。集団内の約600,000,000~1,000,000,000の凝集細胞を、遠心管に移し、100mLの1X DPS-/-を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットにStemPro(登録商標)Accutase(登録商標)酵素を50体積%、及びDPBS-/-を50体積%の溶液30mLを添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで1~3度上下させてから、断続的に室温で約4分間回転させ、その後80~200rcfで5分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase(登録商標)の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約4分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び2~10細胞からなる集団にほぐした。4分後、細胞を、10µMのY-27632(Enzo Life Sciences)及び0.5% w/vのFAF-BSAを補充した100mLのE8(商標)培地に再懸濁させ、80~200rcfで5~12分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mLあたり100,000,000~150,000,000細胞の最終濃度を得るために冷たい(4)Cryostor(登録商標)Cell Preservation Media CS10を滴加した。この細胞溶液を、2mLの極低温バイアル(Corning)に小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレートCryoMed(商標)34Lフリーザーを使用して細胞を凍結した。チャンバを4に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が6に達するまで保持し、次に試料が-7に達するまでチャンバの温度を毎分2下げ、その時点でチャンバが-45に達するまでチャンバを20/分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が-25に達するまで10/分で短時間上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが-40に達するまで0.8/分で更に冷

30

40

50

却した。次にチャンバの温度を、チャンバが -100 に達するまで 10 /分で冷却し、その時点で、次にチャンバが -160 に達するまでチャンバを 35 /分冷却した。チャンバの温度を、次に -160 で少なくとも 10 分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保管庫に移動した。これらの高密度で凍結保存した単一細胞を I S Mとして次に使用した。

【0209】

I S Mのバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター (D A S G I P) に mL あたり $295,000$ 生細胞の播種濃度で播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、 37 の水浴に 120 秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、B S Cに移動させ、解凍された内容物を、 $2mL$ ガラスピペットを介して $50mL$ 円錐管に移した。次に、 $0.5\% w/v$ の F A F - B S A 及び $10\mu M$ の R h o キナーゼ阻害剤 Y - 27632 を補充した $10mL$ の E 8 (商標) 培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、 $80\sim 200rcf$ で 5 分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、 $0.5\% w/v$ の F A F - B S A 及び $10\mu M$ の Y - 27632 を補充した $10mL$ の新鮮な E 8 (商標) 培地を添加し、細胞を含む体積を、 $0.5\% w/v$ の F A F - B S A 及び $10\mu M$ の Y - 27632 を補充した $450mL$ の E 8 (商標) 培地を収容する培地移動ボトル (C a p 2 V 8 (登録商標) , S a n i s u r e , I n c) 内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌 C - F l e x (登録商標) チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリアクター内に直接ポンプで注入した。 37 に予熱し、 $70rpm$ で攪拌した、 $0.5\% w/v$ の F A F - B S A 及び $10\mu M$ の Y - 27632 を補充した $1000mL$ の E 8 (商標) 培地で、 30% の溶存酸素設定値 (調節された空気、 O_2 、及び N_2)、及び 5% の制御された CO_2 分圧によって、バイオリアクターを調製した。 0.225×10^6 細胞 / mL (濃度範囲 : $0.2 \sim 0.5 \times 10^6$ 細胞 / mL) の目標濃度を得るために、リアクターに播種した。

【0210】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で 24 時間後、元の体積の 80% 超を取り除き、 $0.5\% w/v$ の F A F - B S A を補充した $1.5L$ の E 8 (商標) 培地を足し戻したように (新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から 48 時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で 3 日後、使用済み E 8 (商標) 培地を取り除き、分化培地を追加することによって 3 リットルリアクター内の分化が開始された。分化プロトコルを以下に説明する。

【0211】

ステージ 1 (3 日間) :

リアクターを、 37 の温度に設定し、 $70rpm$ で連続的に攪拌した。気体及び pH コントロールを 10% の溶存酸素設定値 (調節された空気、 O_2 、及び N_2) に設定し、 CO_2 調節によって pH を 7.4 に設定した。ステージ 1 基本培地を、追加の $2.4g/L$ 重炭酸ナトリウム、M C D B - 131 に予め再構成された $2\% w/v$ の F A F - B S A ; $1X$ 濃度の G l u t a M A X (商標) ; $2.5mM$ グルコース (45% 水溶液) ; 及び I T S - X の $1:50,000$ 希釈物を補充した、 $1.18g/L$ 重炭酸ナトリウムを含む $1.5L$ の M C D B - 131 培地を使用して調製した。細胞を、 $100ng/mL$ の G D F 8 及び $3\mu M$ の M C X 化合物を補充した $1.5L$ の基本培地で 1 日間培養した。 24 時間後、培地交換を上述のように完了し、 $100ng/mL$ の G D F 8 を補充した新鮮な $1.5L$ の基本培地をリアクターに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を 48 時間維持した。

【0212】

ステージ 2 (3 日間) :

リアクターを、 37 の温度に設定し、 $70rpm$ で連続的に攪拌した。気体及び pH コントロールを 30% の溶存酸素設定値 (調節された空気、 O_2 、及び N_2) に設定し、

CO₂調節によってpHを7.4に設定した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、1.5Lのステージ1基本培地として使用される同じ培地(ただし50ng/mLのFGF7を補充した)と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した300mLの新鮮な基本培地と置換した。

【0213】

ステージ3(3日間)：

ステージ2の完了時、かつ培地交換の直前に、細胞を、カウントし、重力沈降させ、1.5リットル中に2,000,000細胞/mLの正常に戻した濃度で以下のステージ3基本培地に再懸濁させた。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1：200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ3基本培地に50ng/mLのFGF-7；100nMのLDN-193189；2μMのRA；0.25μMのSANT-1；及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に、及びCO₂調節により7.0pHに設定した。培地交換24時間後、使用済み培地を、LDN-193189を除いて、上記添加剤を含む1.5Lの新鮮なステージ3基本培地と再度置換した。細胞をその後、この培地でステージ3の終わりまで48時間培養した。

【0214】

ステージの終わりに、150mLの細胞(1.05×10⁶生細胞/mL)を元の3リットルリアクターから取り出し、無菌で0.2Lリアクターに移した。残りの1.35Lのリアクター容量を以下に説明されるステージ4に従って更に分化した。また、このプロセス及び細胞を、以下、「標準プロセス」及び「標準細胞」と称する。また一方、0.2Lリアクターに移された細胞は、そうしないで、以下のステージ4に従い分化するのではなく、むしろ以下に説明されるようにステージ5に従い更に分化された。また、このプロセス及び細胞を、以下、「スキップ4プロセス」及びスキップ4細胞」と称する。スキップ4プロセスについては、凝集細胞集団を、ステージ3の後に無菌溶接及び蠕動ポンプを使用して0.2Lバイオリアクター(「スキップ4」とラベル付けされた)に取り出して、1.05×10⁶細胞/mLでステージ5培地曝露を開始した。

【0215】

ステージ4(3日間)：

ステージ3の完了時、使用済み培地を取り除き、各バイオリアクター内で以下からなる1.5Lのステージ4基本培地と置換した。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1：200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ4基本培地に0.25μMのSANT-1及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37で維持し、70rpmで攪拌した。気体及びpHを、30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に、及びCO₂調節により7.4のpH設定値に調節した。ステージ4の開始の48時間後、3.2mL/Lの45%グルコース溶液(8mMグルコースブラス)をバイオリアクターに追加し、その培地で更に24時間細胞を培養した。

【0216】

凝集細胞集団(150mL、0.9×10⁶生細胞/mL)を、ステージ4の3日目の終わりに標準プロセス用に無菌溶接及び蠕動ポンプを使用して取り出し、0.2Lバイオリアクター(「標準」とラベル付けされた)に移してステージ5培地曝露を開始した。加えて、いくつかのステージ4、3日目細胞(45×10⁶細胞/mL)を、50mL円錐内の培地から分離し、次に1.18g/L重炭酸ナトリウム及び0.2%w/vのFAF

- BSAを含有するMCD B - 1313培地で2回洗浄した。細胞を、洗浄培地に再懸濁させ、室温で約5時間保持し、その後夜間絶食及びIPグルコースポラス60分後の眼窩後方採血の後に、腹腔内グルコース注射に応じてヒトCペプチド検出を使用した生体内機能のアッセイのために、動物ごとに 5×10^6 細胞にて、NSGマウスの腎臓被膜下に移植した(N = 7動物)。

【0217】

ステージ5(7日間)：

標準及びスキップ4の0.2Lバイオリアクターの中への細胞の播種に続いて、使用済み培地を取り除き、追加の1.75g/L重炭酸ナトリウム；MCD B - 131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；20mMグルコース；ITS-Xの1：200希釈物；250 μ L/Lの1Mアスコルビン酸；10mg/Lヘパリン(Sigma Aldrich；カタログ番号H3149-100KU)を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有するMCD B - 131培地ベースからなる150mLのステージ5+基本培地と置換した。このステージ5基本培地に、1 μ MのT3、10 μ Mの2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン(「ALK5阻害剤II」)、1 μ Mのセクレターゼ阻害剤XXI；20ng/mLのベータセルリン(R&D Systems、カタログ番号261-CE-050)；0.25 μ MのSANT-1；及び100nMのRAを補充した。ステージ5の開始の48時間後、使用済み培地を取り除き、150mLの同じ培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を取り除き、1 μ MのT3、10 μ MのALK5阻害剤II、20ng/mLのベータセルリン、及び100nMのRAを補充したステージ5+基本培地と置換した。48時間後、培地を再度交換し、1 μ MのT3、10 μ MのALK5阻害剤II、20ng/mLのベータセルリン、及び100nMのRAを補充したステージ5+基本培地と置換し、ステージ5の終わりまで24時間培養した。ステージ5の7日間の終わりに、標準及びスキップ4プロセスのそれぞれからの細胞を、上述の方法によって生体内機能について分析するために、NSGマウスの腎臓被膜の中に移植した。

【0218】

分化プロセスを通じて、解析のために懸濁培養から細胞サンプルを収集した。サンプルを、mRNA発現(Open Array(登録商標)qRT-PCR)について、及びフローサイトメトリーによってタンパク質発現について解析した。ステージ3培地からステージ5培地へ分化を直接移動する、スキップ4プロセスは、標準プロセスに従って分化された細胞と比較して、島細胞、内分泌ホルモン発現細胞、及び細胞と関連する遺伝子の発現の増加をもたらしたことが観察された。スキップ4プロセスを使用すると、他に取得する腸の運命と関連する遺伝子は、より低い発現を示したが(ALB及びCDX2；図30B及びD)、一方内分泌ホルモン細胞の形成及び機能に必要な遺伝子は、標準プロセスに見られるより多くの発現を有した(図30A、C、E、F、G、H、J、M、O、Q、S、T、X、及びA'に示されるようなABCC8、ARX、CHGA、CHGB、G6PC2、GCG、IAPP、MAFB、NEUROD1、NKX2.2、PAX4、PAX6、PPY、及びSST)。更に、細胞形成に必要な遺伝子(NKX6.1及びPDX1；図30R及びW)は、スキップ4及び標準プロセスの細胞の両方について、ステージ5の6日目までに同様の濃度で発現した。細胞の機能及び維持に必要な遺伝子(IAPP、INS、ISL1、HB9、PCSK1、PCSK2、SLC30A8、及びUNC3；図30J、K、L、M、U、V、Z、及びB')又は細胞増殖に必要な遺伝子(WNT4A、図30C')は、ステージ5培地で処理されたスキップ4細胞において同様又はより高い濃度で発現した。

【0219】

これらのデータは、スキップ4細胞において、より早い時点で、かつより長い期間、より高い濃度のNGN3誘導(内分泌腺特異化に必要とされる)を示したデータと相関したが、一方PTF1A発現(膵外分泌腺に必要とされる)は、最高で標準プロセスによって

10

20

30

40

50

生成される濃度の1/20に達するだけであった。これらの結果は、スキップ4リアクター内の細胞は、PTF1Aの短い誘導さえもないときに膵内分泌腺の運命にロバストに特定されたことを示し、PTF1Aが細胞を生体外で形成するのに必要とされないことを示唆する。この観察結果は、PTF1Aが更に分化する前にステージ4で発現された当該技術分野において見られる結果、又はステージ4細胞が、ステージ4でPDX1/NKX6.1/PTF1Aのシグネチャによって特徴付けられ、次に様細胞に生体外で更に発達される米国特許公報第2014/0271566(A1)号に記載された発達の想定されたモデルと異なるので重要である。

【0220】

ステージ4、3日目に存在するPTF1A発現(図30Y)細胞集団は、ほぼ均質なPDX1/NKX6.1共発現集団を有し、NEUROD1陽性細胞(フローサイトメトリーでNKX6.1が96.2%、PDX1が99.6%、及びNEUROD1が2.4%)をほとんど有しなかった。細胞は、NSGマウスの腎臓被膜の中に挿入され(5,000,000細胞/動物;N=7)、それから16週間に渡って、血液サンプル中にヒトCペプチドは検出されなかった(データ表示せず)。4つのステージ分化プロセス中に誘導される富化させたNKX6.1/PDX1/PTF1A発現細胞集団は、生着の3か月以内に糖尿病を逆転させることができたことが、当該技術分野において以前に実証されていたので、この結果は、予想外であった。

【0221】

ステージ4、3日目(PTF1A発現)細胞が、標準プロセスに従ってステージ5を通して更に分化されると、移植片は、2週目で検出可能な血中濃度のヒトCペプチドを分泌し(図31)、スキップ4プロセスの細胞(低/無PTF1A)と同様に移植後12週目で $>0.5\text{ ng/mL}$ のヒトCペプチドに達した。これらのデータは、PTF1A発現が、機能的細胞への更なる成熟を確実にするために必要でも十分でもないことを示す。むしろ、PTF1A発現の上昇は、標準ステージ4をスキップし、 $0.5\text{ }\mu\text{M}$ のレチノイン酸、FGF7、及びPKCアゴニスト(TPPB)を含有する培地からセクレターゼ阻害剤、甲状腺ホルモン(T3)、及びALK5阻害剤あり又はなしを含有する培地へ直接細胞を移動することによって回避され得る代替細胞集団の出現を恐らく示している。

【0222】

これらの結果は実証する。ステージ3でのpHの7.2への調節は、NGN3発現を少なくとも80%(図26E参照:BxB及びBxC、対BxD)に抑制し、PTF1A陽性ステージ4細胞集団を経ることなく、PDX1/NKX6.1/インスリン陽性様細胞を含有する島様細胞集団に更に直接分化され得るPDX1/NKX6.1共陽性、PTF1A陰性細胞を発展させることができる。

【0223】

(実施例7)

この実施例は、低培地pH(<7.2)、FGF7、レチノイン酸、及びPKCアンタゴニスト(TPPB)を使用して、攪拌タンクの無菌で閉じたバイオリアクター内で、5ステージの分化プロセスを介しインスリン発現細胞の形成を実証する。ステージ3での低pHの使用は、ステージ3での任意のソニックヘッジホッグ阻害剤(SANT01又はシクロパミンなど)又はTGF- β /BMPシグナル伝達阻害剤又は活性化物質を使用する必要性を省略し、ステージ4の終わりにPDX1(94%)及びNKX6.1(87%)発現細胞の集団を生じたことがわかった。これらの細胞から生成されたステージ5リアクター集団は、高い割合のNEUROD1/NKX6.1共陽性細胞、及びPDX1及びNKX6.1共発現を伴うインスリン陽性細胞を有し、この3つ(NEUROD1、PDX1、NKX6.1)は、適切な膵細胞機能に対してインスリンと共発現されるはずである。一致して、この細胞のステージ5集団が、凍結保存され、解凍され、免疫力が低下したマウスの腎臓被膜の中に移植されたとき、移植片は、生着の2週間以内に検出可能な血中濃度のヒトCペプチド、及び平均で生着4週目で $>1\text{ ng/mL}$ のCペプチドを産生した。

10

20

30

40

50

【0224】

ヒト胚幹細胞株 H1 (WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin)) の細胞を、動的懸濁液の状態の、0.5% w/v の FAF-BSA を補充した E8 (商標) 培地で、丸い凝集集団として 4 の継代の間増殖させた。この集団をそれから、次の方法を通じて単一細胞及び 2 ~ 10 細胞の集団として凍結した。集団内の約 600,000,000 ~ 1,000,000,000 の凝集細胞を、遠心管に移し、100 mL の 1X DPS-/- を使用して洗浄した。洗浄後、ほぐれた細胞凝集体のペレットに StemPro (登録商標) Accutase (登録商標) 酵素を 50 体積%、及び DPBS-/- を 50 体積% の溶液 30 mL を添加することによって、次に細胞凝集体を酵素的に分解した。細胞集団をピペットで 1 ~ 3 度上下させてから、断続的に室温で約 4 分間回転させ、その後 80 ~ 200 rcf で 5 分間遠心分離した。次いで、細胞ペレットを攪乱させることなく、Accutase (登録商標) の上澄を可能な限り完全に吸引した。遠心管を硬質面に約 4 分間軽くたたきつけて、この集団を単一細胞及び 2 ~ 10 細胞からなる集団にほぐした。4 分後、細胞を、10 μ M の Y-27632 (Enzo Life Sciences) 及び 0.5% w/v の FAF-BSA を補充した 100 mL の E8 (商標) 培地に再懸濁させ、80 ~ 200 rcf で 5 ~ 12 分間遠心分離した。上澄を次に吸引し、mL あたり 100,000,000 ~ 150,000,000 細胞の最終濃度を得るために冷たい (4) Cryostor (登録商標) Cell Preservation Media CS10 を滴加した。この細胞溶液を、2 mL の極低温バイアル (Corning) に小分けにしている間氷浴中において保持し、その後次のようにコントロールレート CryoMed (商標) 34 L フリーザーを使用して細胞を凍結した。チャンバを 4 に冷却し、この温度を試料バイアルの温度が 6 に達するまで保持し、次に試料が -7 に達するまでチャンバの温度を毎分 2 下げ、その時点でチャンバが -45 に達するまでチャンバを 20 / 分冷却した。次にチャンバの温度を、温度が -25 に達するまで 10 / 分で短時間に上昇させ、その後チャンバを試料バイアルが -40 に達するまで 0.8 / 分で更に冷却した。次にチャンバの温度を、チャンバが -100 に達するまで 10 / 分で冷却し、その時点で、次にチャンバが -160 に達するまでチャンバを 35 / 分冷却した。チャンバの温度を、次に -160 で少なくとも 10 分間保持し、その後バイアルをガス相液体窒素保管庫に移動した。これらの高密度で凍結保存した単一細胞を ISM として次に使用した。

【0225】

ISM のバイアルを液体窒素保管庫から取り出し、解凍し、3 リットルのガラスの攪拌懸濁液タンクバイオリアクター (DASGIP) に mL あたり 295,000 生細胞の播種密度で播種するために使用した。バイアルを液体窒素保管庫から取り出し、37 の水浴に 120 秒間迅速に移して解凍した。バイアルを、BSC に移動させ、解凍された内容物を、2 mL ガラスピペットを介して 50 mL 円錐管に移した。次に、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 μ M の Rho キナーゼ阻害剤 Y-27632 を補充した 10 mL の E8 (商標) 培地を、その管に滴下方式で添加した。細胞を、80 ~ 200 rcf で 5 分間遠心分離した。管からの上澄を吸引し、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 μ M の Y-27632 を補充した 10 mL の新鮮な E8 (商標) 培地を添加し、細胞を含む体積を、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 μ M の Y-27632 を補充した 450 mL の E8 (商標) 培地を収容する培地移動ボトル (Cap2V8 (登録商標), Sanisure, Inc) 内にピペットで移した。その後、蠕動ポンプによって、無菌 C-Flex (登録商標) チュービング溶接を介して、ボトル内容物をバイオリアクター内に直接ポンプで注入した。37 に予熱し、70 rpm で攪拌した、0.5% w/v の FAF-BSA 及び 10 μ M の Y-27632 を補充した 1000 mL の E8 (商標) 培地で、30% の溶存酸素設定値 (調節された空気、O₂、及び N₂)、及び 5% の制御された CO₂ 分圧によって、バイオリアクターを調製した。0.225 \times 10⁶ 細胞/mL (濃度範囲: 0.2 ~ 0.5 \times 10⁶ 細胞/mL) の目標濃度を得るために、リアクターに播

種した。

【0226】

ひとたびリアクターに播種すると、細胞は、攪拌リアクター内で丸い凝集集団を形成した。培養下で24時間後、元の体積の80%超を取り除き、0.5% w/vのFAF-BSAを補充した1.5LのE8(商標)培地を足し戻したように(新鮮培地)、培地は部分的に交換された。この培地交換プロセスを、播種から48時間後に繰り返した。丸い凝集集団として懸濁培養下で3日後、使用済みE8(商標)培地を取り除き、分化培地を追加することによって3リットルリアクター内の分化が開始された。分化プロトコルを以下に説明する。

【0227】

ステージ1(3日間)：

リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを10%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。ステージ1基本培地を、追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース(45%水溶液)；及びITS-Xの1：50，000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地を使用して調製した。細胞を、100ng/mLのGDF8及び2µMのMCX化合物を補充した1.5Lのステージ1基本培地で1日間培養した。24時間後、培地交換を上述のように完了し、100ng/mLのGDF8を補充した新鮮な1.5Lの基本培地をリアクターに追加した。更なる培地交換をしないで、細胞を48時間維持した。

【0228】

ステージ2(3日間)：

リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に設定し、CO₂調節によってpHを7.4に設定した。ステージ1の完了後、培地交換を上述のように完了し、それによって使用済みステージ1培地を取り除き、1.5Lのステージ1基本培地として使用される同じ培地(ただし50ng/mLのFGF7を補充した)と置換した。培地交換から48時間後、使用済み培地を再度取り除き、50ng/mLのFGF7を補充した1.5Lの新鮮な基本培地と置換した。

【0229】

ステージ3(3日間)：

ステージ2の完了時、かつ培地交換の直前に、細胞を、カウントし、重力沈降させ、1.5リットル中に2,000,000細胞/mLの正常に戻した濃度で以下のステージ3基本培地に再懸濁させた。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaMAX(商標)；2.5mMグルコース；及びITS-Xの1：200希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地。ステージ3基本培地に50ng/mLのFGF-7；1µMのRA；及び400nMのTPBを補充した。リアクターを、37の温度に設定し、70rpmで連続的に攪拌した。気体及びpHコントロールを30%の溶存酸素設定値(調節された空気、O₂、及びN₂)に、及びCO₂調節により7.0pHに設定した。培地交換24時間後、使用済み培地を、上記添加剤を含む1.5Lの新鮮なステージ3基本培地と再度置換した。細胞をその後、この培地でステージ3の終わりまで48時間培養した。

【0230】

ステージ4(3日間)：

ステージ3の完了時、使用済み培地を取り除き、各バイオリアクター内で以下からなる1.5Lのステージ4基本培地と置換した。追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム；MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA；1X濃度のGlutaM

10

20

30

40

50

A X (商標) ; 2 . 5 m M グルコース ; 及び I T S - X の 1 : 2 0 0 希釈物を補充した、
1 . 1 8 g / L 重炭酸ナトリウムを含有する 1 . 5 L の M C D B - 1 3 1 培地。ステージ
4 基本培地に 0 . 2 5 μ M の S A N T - 1 及び 4 0 0 n M の T P B を補充した。リアクタ
ーを、3 7 °C で維持し、7 0 r p m で攪拌した。気体及び p H を、3 0 % の溶存酸素設定
値 (調節された空気、O₂、及び N₂) に、及び C O₂ 調節により 7 . 4 の p H 設定値に
調節した。ステージ 4 の開始の 4 8 時間後、3 . 2 m L / L の 4 5 % グルコース溶液 (8
m M グルコースポラス) をバイオリアクターに追加し、その培地で更に 2 4 時間細胞を
培養した。

【 0 2 3 1 】

ステージ 5 (8 日間) :

ステージ 4 の 3 日目の終わりに、使用済み培地を取り除き、以下からなる 1 . 5 L のス
テージ 5 基本培地と置換した。追加の 1 . 7 5 g / L 重炭酸ナトリウム ; M C D B - 1 3
1 に予め再構成された 2 % w / v の F A F - B S A ; 1 X 濃度の G l u t a M A X (商標
); 2 0 m M グルコース ; I T S - X の 1 : 2 0 0 希釈物 ; 2 5 0 μ L / L の 1 M アスコ
ルビン酸 ; 1 0 m g / L ヘパリンを補充した、1 . 1 8 g / L 重炭酸ナトリウムを含有す
る 1 . 5 L の M C D B - 1 3 1 培地。最初の供給では、ステージ 5 基本培地に 3 , 3 ,
5 - トリヨード - L - チロニンナトリウム塩として 1 μ M の T 3、1 0 μ M の A L K 5 阻
害剤 I I、1 μ M の セクレターゼ阻害剤、X X I ; 2 0 n g / m L のベータセルリン ;
0 . 2 5 μ M の S A N T - 1 ; 及び 1 0 0 n M の R A を補充した。ステージ 5 の開始 4 8
時間後、使用済み培地を取り除き、1 . 5 L の同じ新鮮培地及び添加剤と置換した。4 8
時間後、培地を取り除き、1 μ M の T 3、1 0 μ M の A L K 5 阻害剤 I I、2 0 n g / m
L のベータセルリン、及び 1 0 0 n M の R A を補充したステージ 5 基本培地と置換した。
4 8 時間後、培地を再度交換し、1 μ M の T 3、1 0 μ M の A L K 5 阻害剤 I I、2 0 n
g / m L のベータセルリン、及び 1 0 0 n M の R A を補充したステージ 5 基本培地と置換
し、ステージ 5 の終わりまで 4 8 時間培養した。

【 0 2 3 2 】

ステージ 5 の 8 日目の終わりに (最後の供給から 4 8 時間後)、凝集細胞集団を無菌溶
接及び蠕動ポンプを介しリアクターから取り出し、ペレットの中に遠心分離した。細胞を
冷凍保存するため、2 . 4 3 g / L の重炭酸ナトリウム、3 0 % のゼノフリー K S R、1
0 % の D M S O、及び 2 . 5 % の H E P E S (最終濃度 2 5 m M) を有する 5 7 . 5 % の
M C D B 1 3 1 からなる冷凍保存培地に、細胞を移植した。細胞集団を周囲温度で冷凍保
存培地内に懸濁した後で、クライオバイアルを自動凍結保存装置 (C R T) に 1 5 分以内
で移植した。次いで、チャンバ温度を 4 5 分間 4 °C に下げ、2 . 0 0 °C / 分で - 7 . 0
°C (試料) まで更に下げた。サンプルを次に急速に冷却し、2 5 . 0 °C / 分の速度でチャン
バの温度を - 4 5 . 0 °C まで下げた。次いで補正上昇が、チャンバ温度を - 2 5 . 0 °C (
チャンバ) まで 1 0 . 0 °C / 分、上昇させることによって提供された。サンプルを次に、
温度が - 4 0 . 0 °C に達するまで 0 . 2 °C / 分で冷却した。チャンバを次に、- 1 6 0 °C
まで 3 5 . 0 °C / 分の速度で冷却し、その温度で 1 5 分間保持した。C R F 運転の終了時
に、試料をガス相液体窒素保管容器に移植した。

【 0 2 3 3 】

細胞をガス相液体窒素で保存した後、保管場所から除去することによって細胞を解凍し
、3 7 °C の水浴に移植した。小さい氷晶がバイアルに残るまで、バイアルを 2 分未満水浴
内で静かに渦流した。次いで、バイアル内容物を 5 0 m L の円錐に移植し、2 . 4 3 g /
L の重炭酸ナトリウム及び 2 % の B S A を有する M C D B 1 3 1 培地を使用して、合計 2
0 m L の最終体積になるまで、滴下式で 2 分以上希釈した。全細胞数を、次に N u c l e
o c o u n t e r (登録商標) によって測定した。細胞は、次に、5 0 m L 円錐内の培地
から分離され、上澄は除去され、細胞は 2 . 4 3 g / L 重炭酸ナトリウム及び 2 % B S A
を含む新鮮な M C D B 1 3 1 培地に再懸濁され、m L あたり 1 , 0 0 0 , 0 0 0 細胞の細
胞濃度で 7 5 m L の容量にて満たされた 1 2 5 m L の C o r n i n g (登録商標) スピナ
ーフラスコに移動された。細胞を、5 5 R P M で攪拌される加湿、5 % C O₂ インキュベ

10

20

30

40

50

ータ内で一晚維持し、翌日細胞を、フローサイトメトリーによって解析した。細胞は、3回の反復でNKX6.1 / NEUROD1共陽性が50%超(図32)、NKX6.1 / NEUROD1共陽性が80%超(図33)、及び解凍後NKX6.1 / インスリン共陽性が少なくとも35%(図34)であった。更に、これらの細胞をNSGマウスの腎臓被膜下に移植したとき(投与あたり5,000,000細胞; N=7)、全ての動物は、検出可能な濃度のCペプチドを有し、またそれらの動物は、移植の4週間以内に算術平均(mean average)で $> 1 \text{ ng / mL}$ のCペプチドを分泌した。移植6週間後に、移植された7匹の動物のうち5匹が、グルコース応答性インスリン(ヒトCペプチド)の非刺激レベルを超える分泌を示し(図35)、12週目で7匹の動物全てが、グルコース応答性インスリン(ヒトCペプチド)の分泌を示した(図36)。

10

【0234】

これらのデータは、NKX6.1 / インスリン共発現細胞は、ステージ3でpH及び溶存酸素調節を使用して生成されて、攪拌タンクリアクター内の5番目のステージを介しNEUROD1 / NKX6.1 / PDX1 / インスリン共発現へと更に分化され得るステージ4でNKX6.1 / PDX1陽性細胞の収率もまた最大にしなが、TGF- β / BMP又はソニックヘッジホッグシグナル伝達をブロックするために、タンパク質又は小分子の必要性を省略することができることを示す。細胞は、冷凍保存し、解凍し、移植することができ、移植の4週間以内にグルコース誘発性インスリン分泌($> 1 \text{ ng / mL}$ のCペプチド)によって測定されるように生体内で機能し、移植後12週目でグルコース応答性を実証するだろう。

20

【0235】

(実施例8)

本実施例は、3Lの使い捨てスピナーフラスコを使用して攪拌される懸濁培養内でインスリン発現細胞の形成を実証する。培地及び気体を、取り外し可能な通気式サイドアームキャップを通じて交換した。インスリン陽性細胞は、細胞がPDX1を最初に発現し、次にNKX6.1も共発現した段階的なプロセスで形成された。これらの共発現細胞は、次に、懸濁培養内にある間にPDX1及びNKX6.1と組み合わせて、インスリン及びその後MAFAの発現を得た。

【0236】

ヒト胚幹細胞株H1(WA01 cells, WiCell Research Institute (Madison, Wisconsin))の細胞を、Matrigel(商標)を付着マトリックスとして使用してmTeSR1(商標)培地で接着培養条件において4継代の間増殖させ、より大きな容器の中に持続的に拡大した。細胞は、第4の継代で複数の5層の細胞スタック(「CS5」)の中に播種された。継代72時間後、各CS5内の細胞密集度は、70~80%に達した。使用済み培地を取り除き、細胞をPBSで洗浄した。37°Cに予熱した300mLのVersene(商標)を次いで細胞に追加し、細胞を次に37°C(5%CO₂)で8.5分間インキュベートした。インキュベーション時間後、フラスコ内に約50mLの残留Versene(商標)を残してEDTAを注意深くフラスコから取り出した。細胞層を、それから細胞集団を除去するために容器の断続的なタップを受けながら、残留Versene(商標)で3分間インキュベートし続けさせた。この残留インキュベーションの3分後、10 μ MのY-27632(Enzo Life Sciences)を含有する250mLのmTeSR1(商標)をフラスコに追加して、細胞分離プロセスをクエンチし、浮き上がった細胞集団を収集した。洗浄培地を次に丸型ボトルに移し、CS5を、150 μ MのY-27632を含有する追加の150mLのmTeSR1(商標)で洗浄し、第1の洗浄液をためた。200,000,000細胞を次に未塗装であるが、組織培養処理したCS1に移し、追加の培地を補充して、mLあたりの1,000,000細胞の細胞密度で200mLの最終体積を得た。

30

40

【0237】

浮き上がった細胞を含有するCS1を37°Cで2時間インキュベートした。2つのCELLISTACKポート間に結合された、ポンプチュービングを有する、閉ループのC-fl

50

e xチューピングを使用して、細胞懸濁液を蠕動ポンプによって75rpmで5分間微粉化して、凝集体を均質化した。ポンプチューピングアセンブリを次に、0.2μMの通気式キャップと置換し、12~22時間の夜間インキュベーション用に37℃インキュベータに戻した。インキュベーション後、細胞は、多能性細胞の丸い球状凝集集団を形成した。

【0238】

新しく形成された集団を含有する600mLの3つのCS1容器を、次にそれぞれ、結果として得られるmLあたり約300,000細胞の細胞密度で10μMのY-27632を含有する追加の1200mLの新鮮な予熱されたmTESR1(商標)と共に3L使い捨てスピナーフラスコに移した。スピナーフラスコを次に37℃及び40rpmの撹拌速度でインキュベートした。インキュベーションの24時間後、細胞を撹拌から取り出し、集団をフラスコの底部に8分間沈降させた。その後1.5Lの使用済み培地を、容器の底部に止まっている集団を回避して上部から吸引した。1.5mLの新鮮なmTESR1(商標)培地を細胞に追加し、それらを40rpmで更に24時間増殖させるためインキュベータ内に戻した。72時間の終わりに、多能性集団は、分化培地に遷移された。分化プロトコルを以下に説明する。

【0239】

ステージ1(3日間)：

4つのスピナーフラスコのそれぞれを、動的懸濁液から撹拌なしでBSC内のインキュベータに移した。以下に説明されるように完全培地交換を実行して、残留の使用済み培地だけが新しい培地に持ち越されるようにした。完全培地交換を実行するために、集団を、フラスコの底部まで8分間沈降させた。使用済み培地を、次に300mLだけが残るまで液体の上部から真空吸引を使用して取り除いた。残りの細胞体積を150mL円錐管に移し、800rpmで3分間遠心分離した。真空吸引システムを使用して、残りの使用済み培地を、細胞集団ペレットの破壊なしに取り除いた。ペレットを、次に追加の2.4g/L重炭酸ナトリウム、MCDB-131に予め再構成された2%w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5mMグルコース(45%水溶液); 及びITS-Xの1:50,000希釈物を補充した、1.18g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5LのMCDB-131培地を含有する1.8Lの基本培地に再懸濁させた。細胞を、1.8mLのGDF8及び540μLのMCX化合物を補充した1.8Lのステージ1基本培地で1日間培養した。細胞カウントを計数して、分化の開始時にmLあたり500,000細胞の開始密度を確認した。フラスコを次に、下表XVIIに示されるように条件ごとに2種類の速度でスピナープレート上のインキュベータに戻した。スピナーフラスコを、夜間インキュベートした。

【0240】

【表19】

表XVII 分化を通じて使用された条件

条件	集団形成中のリフティング剤	分化中の撹拌速度
A	EDTA	27rpm
B	EDTA	33rpm
C	Accutase	27rpm
D	Accutase	33rpm

【0241】

約24時間後、培地交換を完了して、使用済み培地から約90%を取り除き、1.8mLのGDF8を補充した新鮮な1.8Lの基本培地と置換した。培地交換を実行するために、集団を、フラスコ底部に8分間沈降させ、使用済み培地を300mLだけが残るまで真空吸引を使用して取り除いた。残りの細胞を250mL円形ボトルの中に移し、集団を6分間沈降させ、その後残留使用済み培地の10%以下が次の供給へ移されることを確実

にするために、ピペットを使用して培地を取り出して細胞を含有する180 mLの培地だけが残されるようにした。残りの細胞及び培地を、次に1.8 Lの新鮮培地と共にスピナーフラスコに戻し、48時間インキュベートさせた。

【0242】

ステージ2 (3日間) :

上述のように完全培地交換を実行して、ステージ1使用済み培地を全て取り除き、細胞を1.8 Lのステージ1基本培地として使用される同じ培地(ただし1.8 mLのFGF7を補充した)の中に移した。フラスコを次にインキュベータに戻して、48時間培地交換をしないで動的攪拌を維持した。その後180 mLの使用済み培地を残して、使用済み培地を再度取り除き、1.8 mLのFGF7を補充した1.8 Lの新鮮な基本培地を追加した。細胞を次に24時間インキュベートした。

10

【0243】

ステージ3 (3日間) :

ステージ2の完了時に、完全培地交換を実行して、ステージ2培地を全て取り出し、細胞を以下の1.5 Lの培地に移した。追加の2.4 g/L重炭酸ナトリウム; MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5 mMグルコース; 及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5 LのMCDB-131培地。ステージ3基本培地に、1.5 mLのFGF-7; 75 µLのRA; 及び120 µLのTPBを補充した。培地は、「暗条件」下で調製された。フラスコの全容量を1.8~2.0 Lから1.5~1.65 Lに減少させて、mLあたり約1,500,000~2,000,000細胞の細胞密度を標的にした。フラスコを24時間インキュベートした。その後150 mLの使用済み培地を後に残し、上述の添加剤を含有する1.5 Lの新鮮なステージ3基本培地を追加して培地交換を実行した。細胞をその後、この培地でステージ3の終わりまで48時間培養した。

20

【0244】

ステージ4 (3日間) :

ステージ3の完了時、完全培地交換を実行して、細胞を以下からなる1.5 Lのステージ4基本培地の中に移した。追加の2.4 g/L重炭酸ナトリウム; MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 2.5 mMグルコース; 及びITS-Xの1:200希釈物を補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5 LのMCDB-131培地。ステージ4基本培地に150 µLのSANT-1及び120 µLのTPBを補充した。フラスコを次にインキュベータに戻して、48時間培地交換をしないで動的攪拌を維持した。48時間の終わりに、5.28 mLの45%D-グルコース溶液をスピナーに追加し、フラスコを更に24時間に戻した。

30

【0245】

ステージ5 (3日間) :

ステージ4の3日目の終わりに、使用済み培地を取り除き、以下からなる1.5 Lのステージ5基本培地と置換した。追加の1.75 g/L重炭酸ナトリウム; MCDB-131に予め再構成された2% w/vのFAF-BSA; 1X濃度のGlutaMAX(商標); 20 mMグルコース; ITS-Xの1:200希釈物; 250 µL/Lの1Mアスコルビン酸; 10 mg/Lヘパリンを補充した、1.18 g/L重炭酸ナトリウムを含有する1.5 LのMCDB-131培地。ステージ5基本培地に3,3',5-トリヨード-L-チロニンナトリウム塩として1 µMのT3、10 µMのALK5阻害剤II、1 µMのセクレターゼ阻害剤XXI; 20 ng/mLのベータセルリン; 0.25 µMのSANT-1; 及び100 nMのRAを補充した。ステージ5の開始48時間後、使用済み培地を取り除き、1.5 Lの同じ新鮮培地及び添加剤と置換した。48時間後、培地を取り除き、1 µMのT3、10 µMのALK5阻害剤II、20 ng/mLのベータセルリン、及び100 nMのRAを補充したステージ5基本培地と置換した。それから分化を、

40

50

ステージ5の終わりまで48時間継続した。

【0246】

ステージ5の終わりに、凝集細胞集団を、フラスコの底部に8分間沈降させ、培地を約300mLの液体が残るまで真空吸引を使用して取り除いた。残りの細胞体積を150mL円錐管に移し、800rpmで3分間遠心分離し、続いて残りの使用済み培地を除去した。細胞ペレットを、洗浄培地、基本MCDB1313に再懸濁させた。細胞を再度、800rpmで5分間遠心沈殿させた。細胞を冷凍保存するため、2.43g/Lの重炭酸ナトリウム、20%のゼノフリーKSR、10%のDMSO、及び2.5%のHEPES（最終濃度25mM）を有する57.5%のMCDB1313からなる冷凍保存培地に、細胞を移植した。細胞集団を周囲温度で冷凍保存培地内に懸濁した後で、クライオバイアルを自動凍結保存装置（CRT）に15分以内で移植した。次いで、チャンバ温度を45分間4℃に下げ、2.00℃/分で-7.0℃（試料）まで更に下げた。サンプルを次に急速に冷却し、25.0℃/分の速度でチャンバの温度を-45.0℃まで下げた。次いで補正上昇が、チャンバ温度を-25.0℃（チャンバ）まで10.0℃/分、上昇させることによって提供された。サンプルを次に、温度が-40.0℃に達するまで0.2℃/分で冷却した。チャンバを次に、-160℃まで35.0℃/分の速度で冷却し、その温度で15分間保持した。CRF運転の終了時に、試料をガス相液体窒素保管容器に移植した。

10

【0247】

細胞をガス相液体窒素で保存した後、保管場所から除去することによって3つのバイアルの細胞を解凍し、37℃の水浴に移植した。小さい氷晶がバイアルに残るまで、バイアルを2分未満水浴内で静かに渦流した。バイアル内容を次にスピナーフラスコに移し、1.6g/L重炭酸ナトリウム、8mMグルコース、1xのITS-X、及び2%BSAの最終濃度に達するように補充されたMCDB131培地を使用して、手でスピナーを連続的に混合しながら10mLの解凍培地を滴下方式で添加した。3つのバイアル全てを解凍した後、追加の解凍培地を約80mLの目標体積に達するように追加した。スピナーフラスコを次いで加湿インキュベータにおいて5%CO₂で一晩（16~24時間）、及び38~40rpmの穏やかな攪拌の下インキュベートした。翌日、細胞以下のように洗浄した。スピナーをフード内で6分間沈降させ、約75mLの使用済み培地を吸引し、同時に残りの細胞懸濁液を、10mLガラスピペットを使用して50mL円錐管に移し、続いて600rpmで3分間遠心分離した。上澄を吸引し、細胞ペレットを10mL洗浄培地に再懸濁させ、その後細胞を600rpmで3分間再度遠心分離した。吸引、及び10mLの洗浄培地における細胞ペレットの再懸濁後、ペレットを60mLの洗浄培地が追加されたスピナーフラスコに移し戻した。解析及び移送のために細胞を収集するだけでなく細胞回復を得るために、フラスコを次にBSC内のスピンプレート上に置き、均質のよく混合されたスピナーからサンプルを収集した。

20

30

【0248】

図37A及び37Bは、スピナーフラスコ内の培養培地のpHプロファイルを示す。培地のpHは、インキュベータ（設定値、5%）内のCO₂及び代謝活性、具体的には図38に示される細胞の乳酸産生によって調節される。最低pH環境による培地、具体的には条件Aは、最高の乳酸濃度も有したことが示される。図37A及びBに見られるように、全てのスピナーのpHは、ステージ2の間、約6.8~7.2、及びステージ3を通じて約7.0~7.2の範囲に及んだ。ステージ3の完了後、ほとんど全ての細胞が内胚葉転写因子FOXA2及び膀胱特異的転写因子PDX1の両方を発現したことが観察された。少なくとも50%は、NEUD1陽性である小さな集団と共にNKX6.1を発現することが検出された。ステージ3の更に48時間後（ステージ4、2日目の終了）、NKX6.1集団は、表XVIIに示されるようにAccutaseで元々浮き上がっていた集団が約65%に増加し（条件C及びD）、EDTAで元々浮き上がっていた細胞の集団が約70~75%に増加した。

40

【0249】

50

【表 2 0】

表 X V I I I

		FOXA2	PDX1	NKX6.1	NEUROD1	NKX6.1 / NEUROD1 共陽性
ステージ3	条件A (EDTA27)	99.8	99.6	66.2	2.8	1.1
ステージ3	条件B (EDTA33)	99.7	98.4	61.7	4.1	1.3
ステージ3	条件C (Accutase27)	99.1	98.1	49.8	2.5	0.5
ステージ3	条件D (Accutase33)	99.1	97.7	55.6	4.9	1.2
ステージ4	条件A (EDTA27)	99.5	99.3	73.5	23.8	5.5
ステージ4	条件B (EDTA33)	99.3	97.8	73.7	24	6.5
ステージ4	条件C (Accutase27)	98.5	94.5	68.9	19.9	4.1
ステージ4	条件D (Accutase33)	98.0	91.5	65.9	20.1	4.9

10

【0 2 5 0】

ステージ5の6日目の終了時に、冷凍保存される前にフローサイトメトリーによって細胞を再度解析した。

20

【0 2 5 1】

【表 2 1】

表 X I X ステージ5 タンパク質発現

		PDX1	NKX6.1	NKX6.1 / NEUROD1 共陽性	(インスリン) NKX6.1 / Cペプチド共陽性	(Cペプチド) NKX6.1 / Cペプチド共陽性	PAX6
ステージ5	条件A(EDTA27)	96.0	80.8	(82.6);70.4	(34.5);26.6	(35.9);26.4	68.7
ステージ5	条件B(EDTA33)	93.6	82.1	(74.9);66.1	(39.3);30.7	(39.6);30.6	62.3
ステージ5	条件C(Accutase27)	94.4	84.3	(74.0);65.3	(33.0);27.1	(32.9);26.2	60.0
ステージ5	条件D(Accutase33)	92.9	79.1	(75.4);63.5	非適用	(34.3);26.9	60.9

30

【0 2 5 2】

表 X X に示されるように未使用の（予め凍結保存した）解析との比較のために、解凍した細胞を、フローサイトメトリーによって評価した。細胞回復は、最終細胞集団を、解凍に際し（ $t = 0$ ）元の集団と比較することによって評価された。細胞の生存性は、図 3 9 に示されるようにライブ/デッド蛍光撮像によって定性的に評価され、 $t = 0$ のものと比較した。

【0 2 5 3】

【表 2 2】

表 X X

		PDX1	NKX6. 1	(NEUROD1) NKX6. 1/ NEUROD1共陽性	(クロモグラニン) NKX6. 1/CHG 共陽性	(Cペプチド) NKX6. 1/C-PEP. 共陽性	PAX6
条件A(EDTA27)	24HAT ¹ *	87. 3	72. 0	(77. 4)59. 8	(74. 0)54. 0	(32. 6)22. 1	26. 8
条件A(EDTA27)	24HAT ²	83. 5	77. 4	(82. 6)63. 1	非適用	(29. 6)19. 9	41. 8
条件A(EDTA27)	24HAT ³	82. 1	73. 4	(74. 0)58. 9	非適用	(30. 7)17. 4	48
条件B(EDTA33)	24HAT ¹	89. 4	77. 4	(75. 9)62. 8	(72. 4)56. 6	(33. 5)25. 6	33. 3
条件B(EDTA33)	24HAT ²	79. 8	80	(80. 8)66. 1	非適用	(27. 6)20. 2	32. 3
条件C(Accu. 27)	24HAT ¹	82. 2	68. 7	(68. 1)53. 3	(64. 8)46. 6	(24. 2)17. 9	17. 6
条件C(Accu. 27)	24HAT ²	84. 0	82. 2	(70. 0)62. 0	非適用	(25. 6)20. 9	24. 3
条件D(Accu. 33)	24HAT ¹	89. 6	71. 4	(72. 8)58. 6	(70. 1)52. 8	(40. 8)32. 1	28. 5
条件D(Accu. 33)	24HAT ²	70. 3	72. 3	(72. 4)53. 2	非適用	(24. 7)17. 2	42. 1

* 「24HAT」は、解凍から24時間後を意味し、上付き文字は試験番号を指す。

【0254】

上記の開示に基づく発明の例として、以下のものが挙げられる。

[1] ヒト多能性細胞の分化の方法であって、約7.2～約7.0のpHで少なくとも約24時間、動的懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養することによって、前腸内胚葉細胞を腭内胚葉細胞に分化させる工程を含む、方法。

[2] 約1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、[1]に記載の方法。

[3] 約2,000,000細胞/mL以上の細胞濃度を有する培養下で前記前腸内胚葉細胞を培養することを更に含む、[1]に記載の方法。

[4] 前記腭内胚葉細胞が、PTF1A及びNGN3の発現に対して実質的に陰性である、[1]に記載の方法。

[5] PTF1A及びNGN3の発現に対して実質的に陰性である前記腭内胚葉細胞を、PDX1及びNKX6.1の共発現に対して陽性であり、かつPTF1Aの発現に対して陽性である細胞を約96%以上有する腭内胚葉細胞の集団に富化させる(enriching)ことを更に含む、[4]に記載の方法。

[6] PTF1A及びNGN3の発現に対して実質的に陰性である前記腭内胚葉細胞を、PTF1A発現に対して陽性の細胞が産生される分化ステージを含まずに腭内分泌腺細胞に分化させることを更に含む、[4]に記載の方法。

[7] ヒト多能性細胞の分化の方法であって、約7.2～約7.0のpH、少なくとも約24時間、約1,500,000細胞/mL以上の細胞濃度、及び約0.5～約1.0μMのレチノイド濃度で、動的懸濁培養において前腸内胚葉細胞を培養することによって、前記前腸内胚葉細胞を腭内胚葉細胞に分化させる工程を含み、

前記培養が、TGF-シグナル伝達及びBMPシグナル伝達の阻害、ブロック、活性化、又は刺激のうち1つ又は2つ以上を行う成分がないとき、かつソニックヘッジホッグシグナル伝達経路阻害剤がないときに実行される、方法。

以上、本発明を、様々な特定の材料、手順及び実施例を参照しながら本明細書に説明及び例示したが、本発明は、その目的のために選択された特定の材料及び手順の組み合わせに限定されない点は理解されるであろう。当業者には認識されるように、このような細部には多くの変更を行い得ることが示唆される。本明細書及び実施例はあくまで例示的なものとしてみなされるべきものであり、発明の真の範囲及び趣旨は以下の「特許請求の範囲」によって示されるものである。本出願において引用される参照文献、特許及び特許出願は、いずれもそれらの全容を参照により本明細書に援用するものとする。

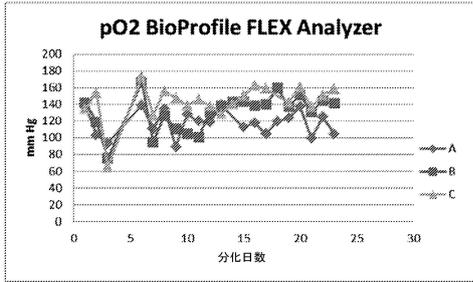
10

20

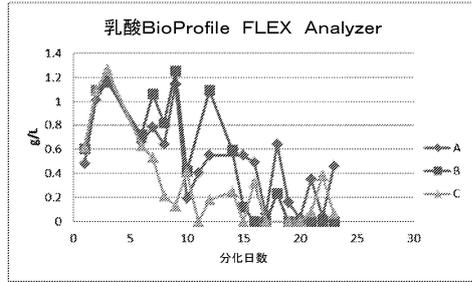
30

40

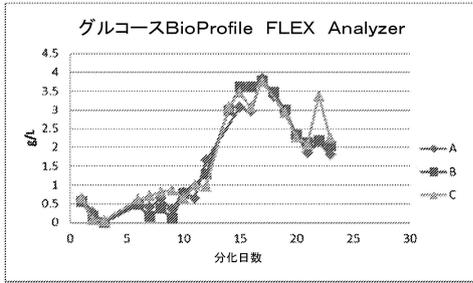
【 図 1 A 】



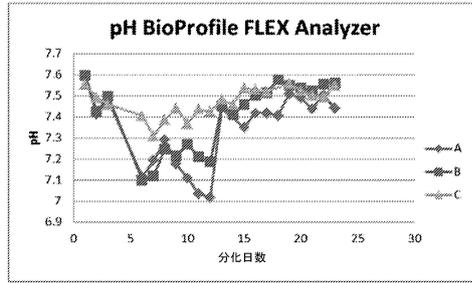
【 図 1 C 】



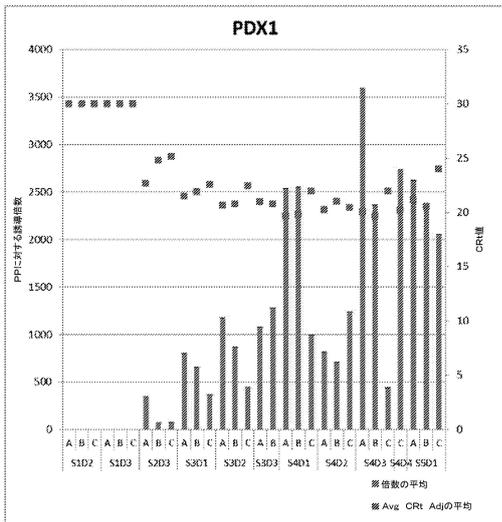
【 図 1 B 】



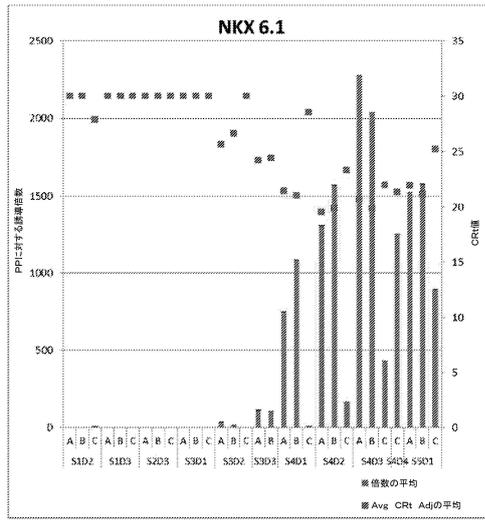
【 図 1 D 】



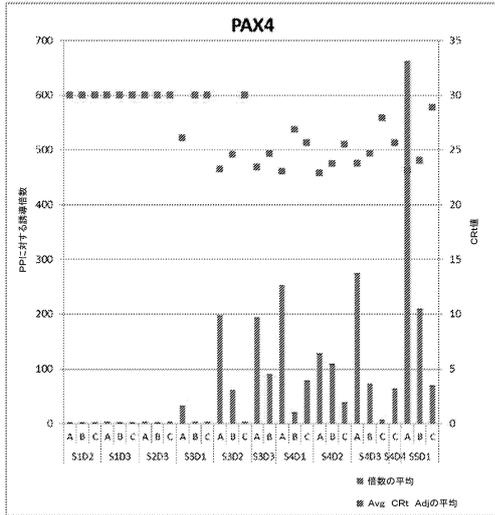
【 図 2 A 】



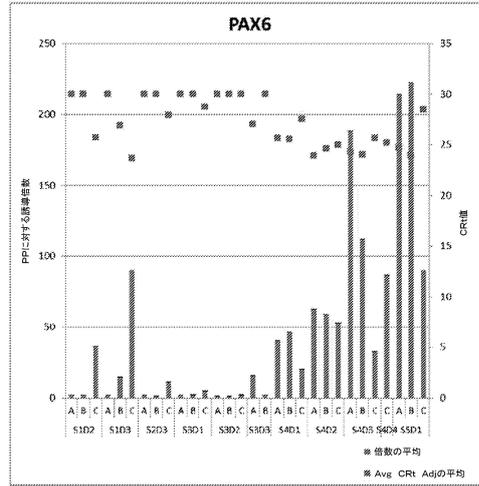
【 図 2 B 】



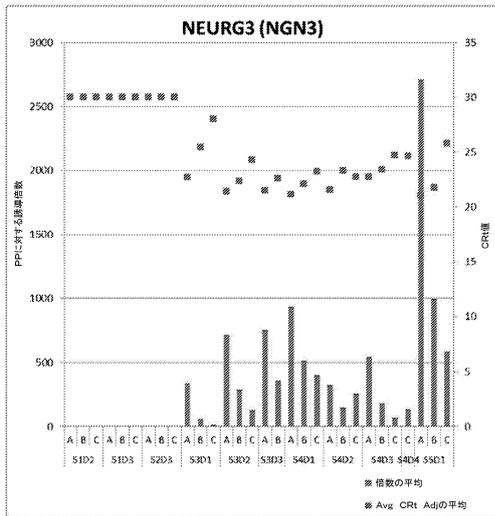
【 2 C 】



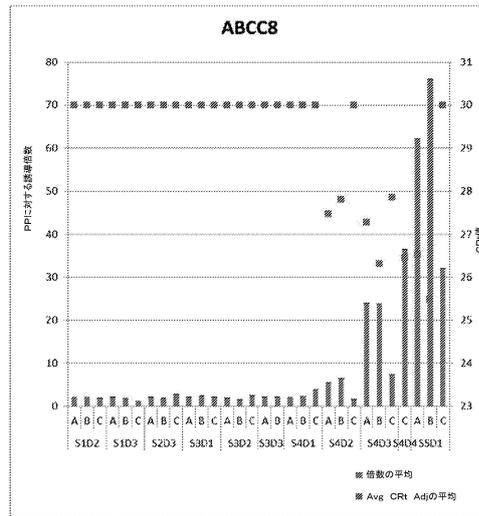
【 2 D 】



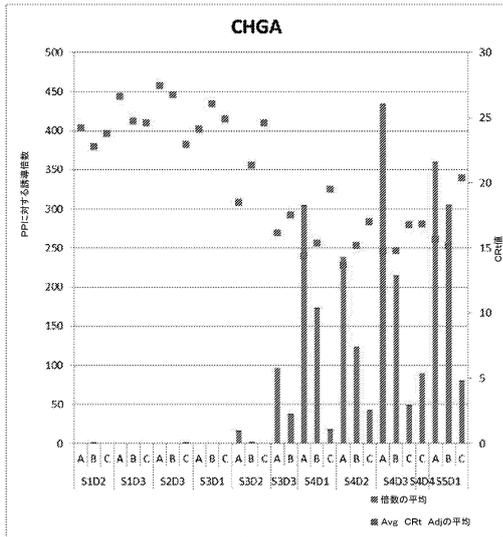
【 2 E 】



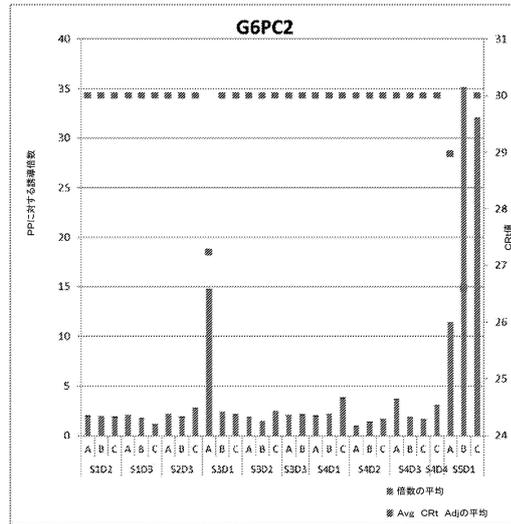
【 2 F 】



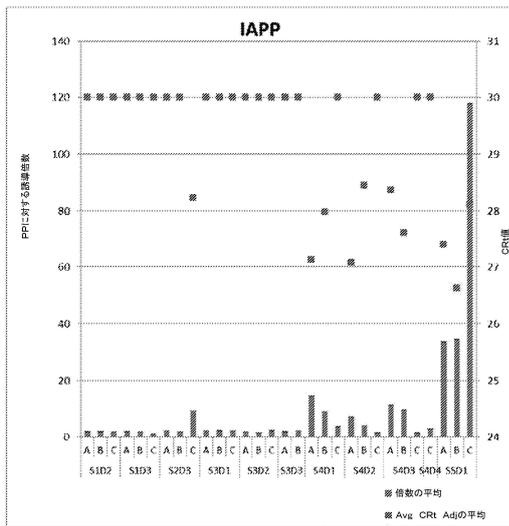
【 2 G 】



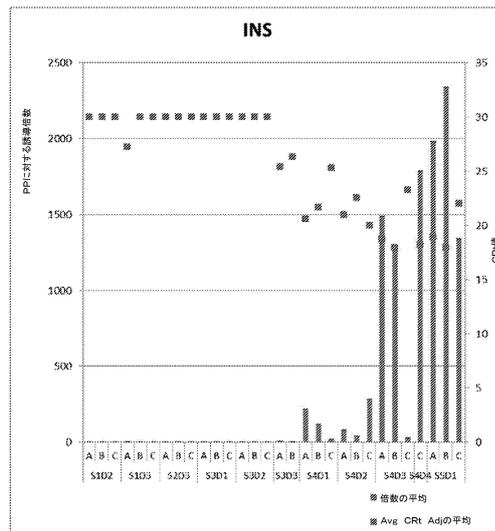
【 2 H 】



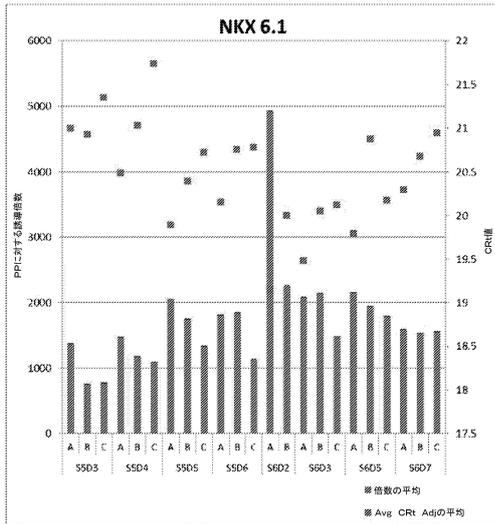
【 2 I 】



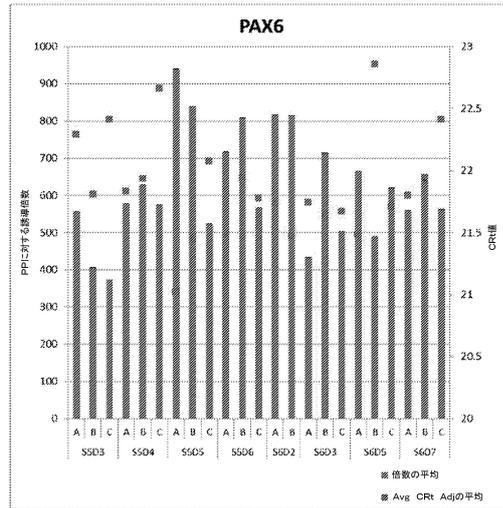
【 2 J 】



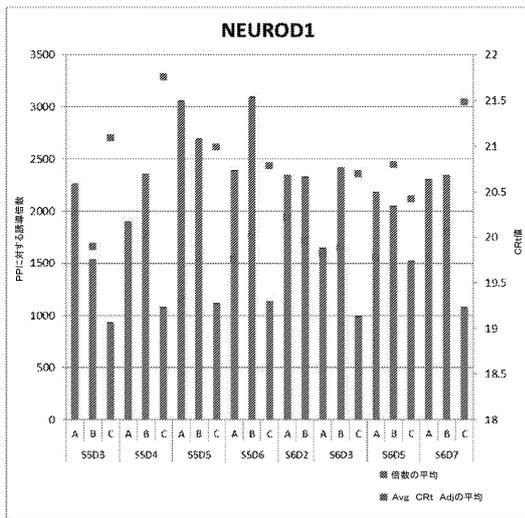
【 図 3 B 】



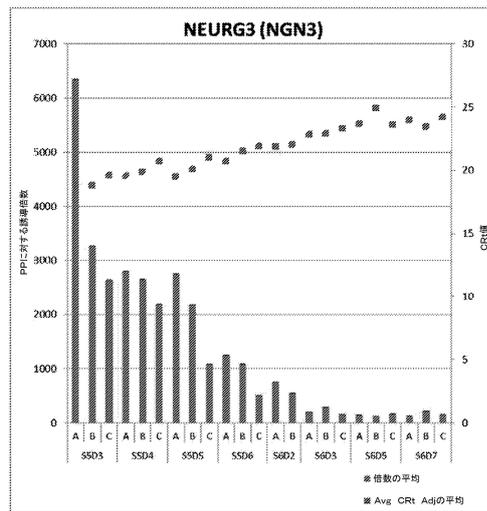
【 図 3 C 】



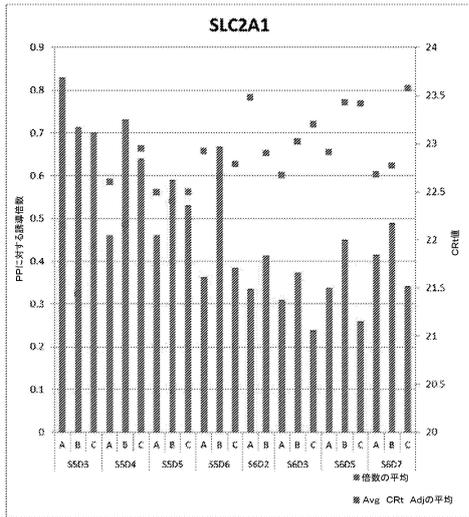
【 図 3 D 】



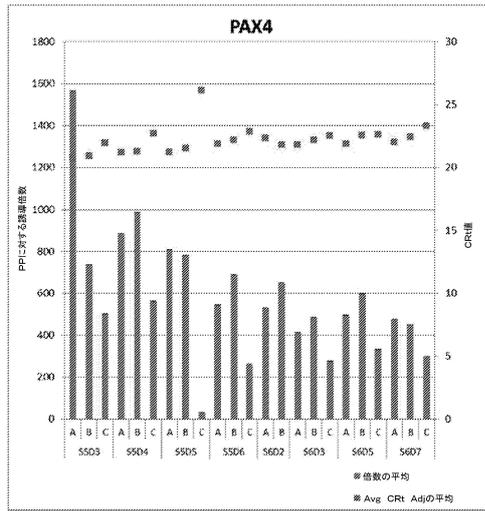
【 図 3 E 】



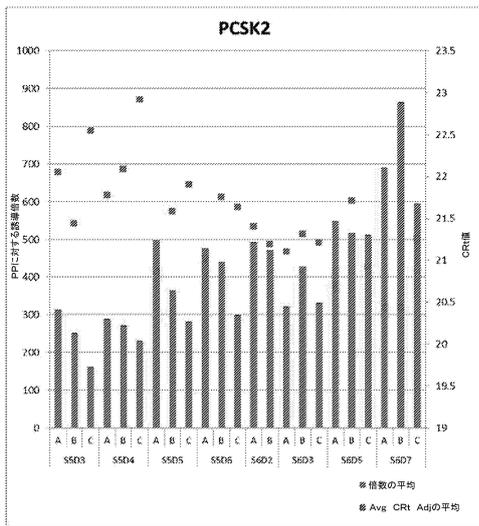
【 3 F 】



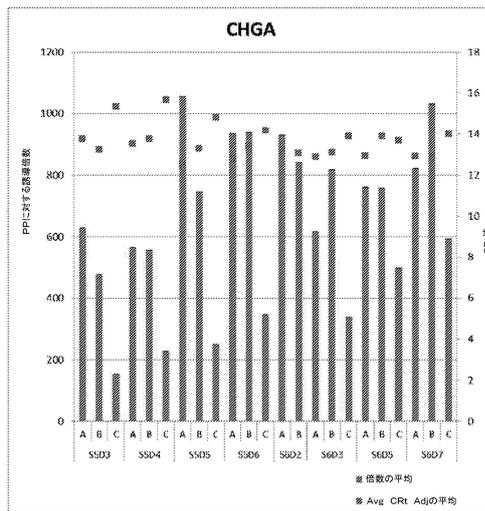
【 3 G 】



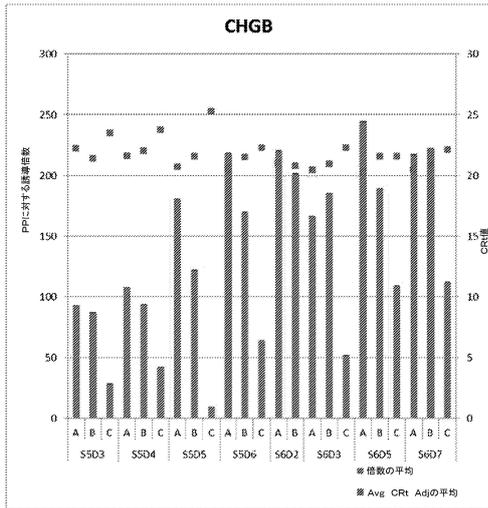
【 3 H 】



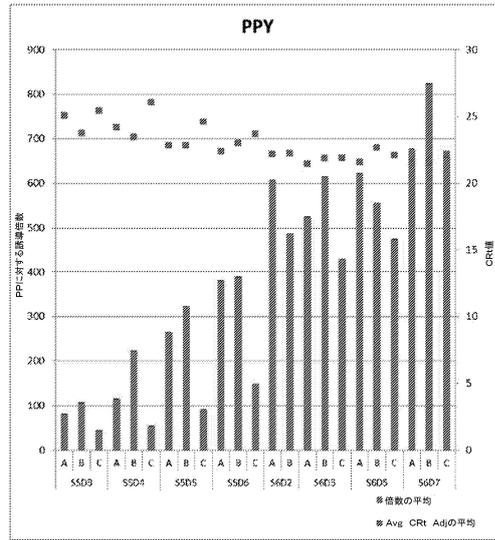
【 3 I 】



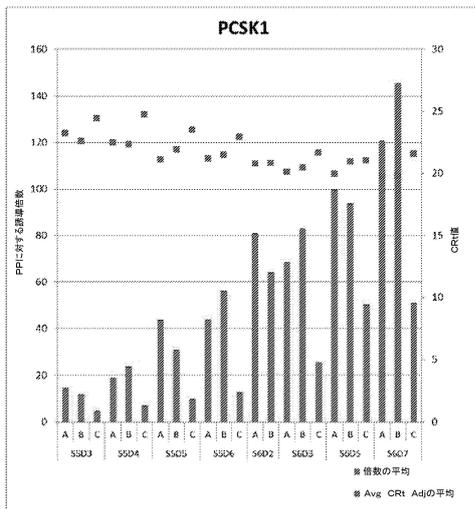
【 3 J 】



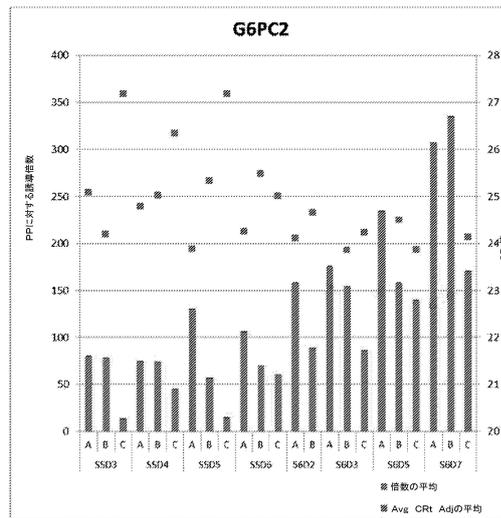
【 3 K 】



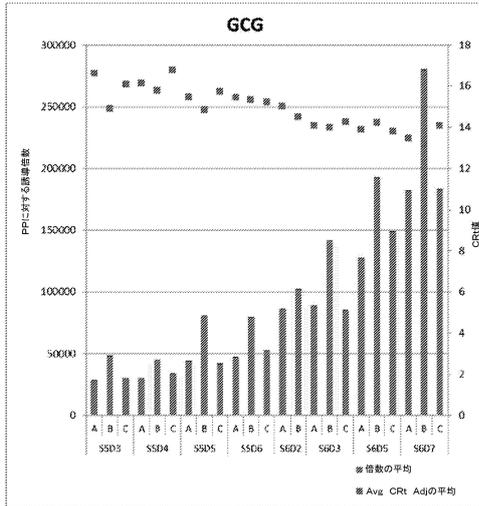
【 3 L 】



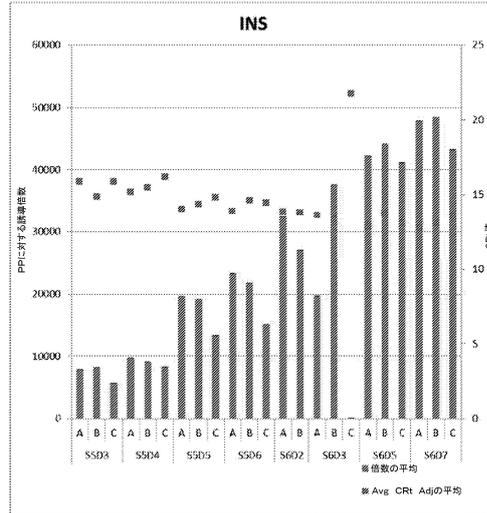
【 3 M 】



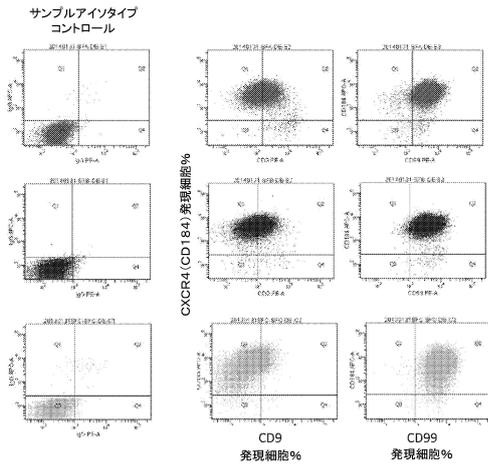
【図3N】



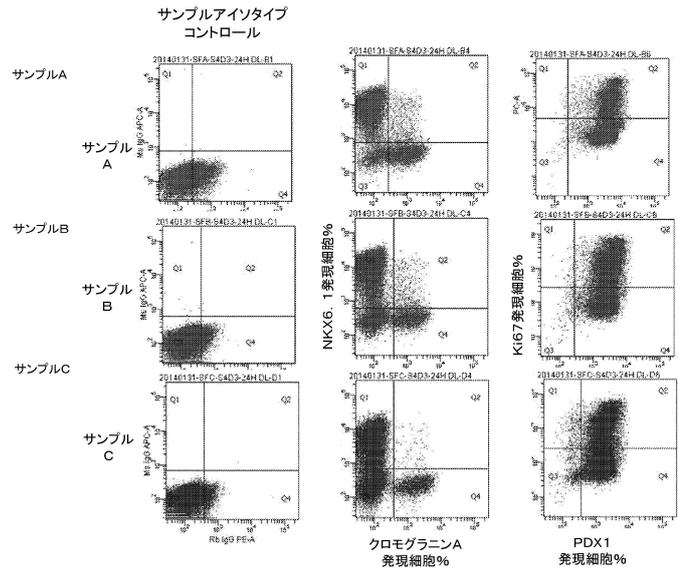
【図3O】



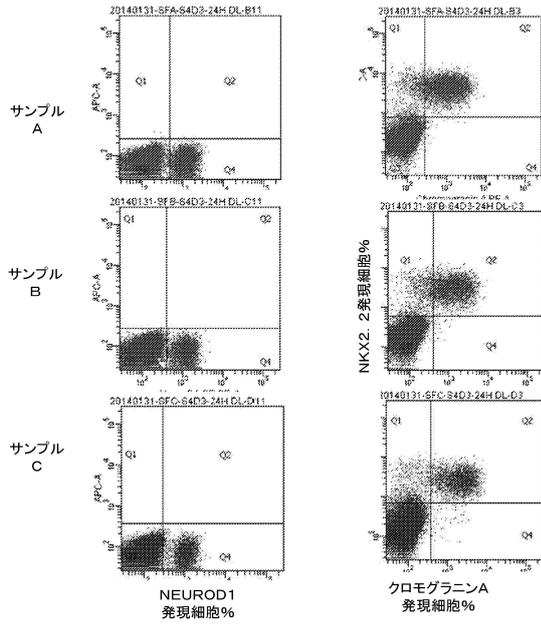
【図4】



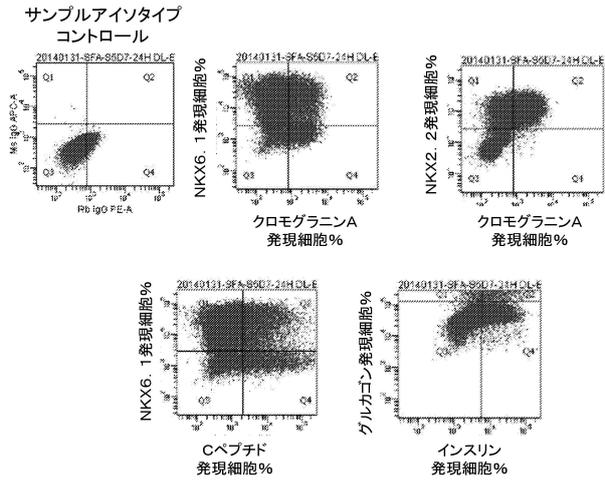
【図5A】



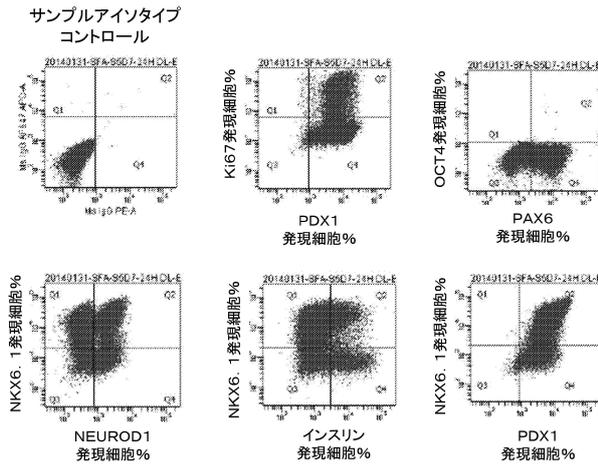
【図5B】



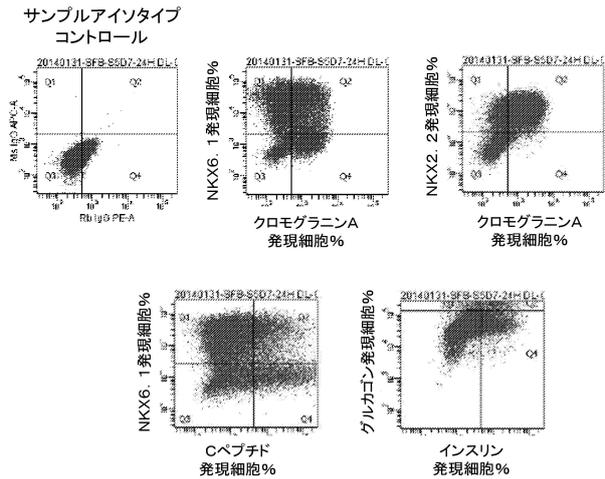
【図6A】



【図6B】

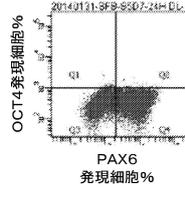
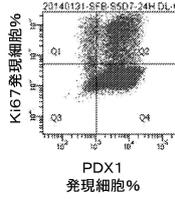
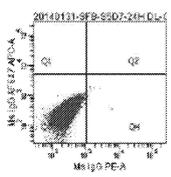


【図7A】



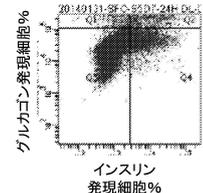
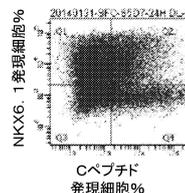
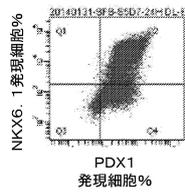
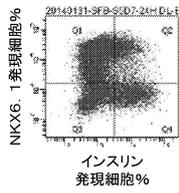
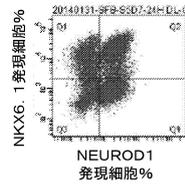
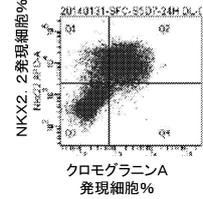
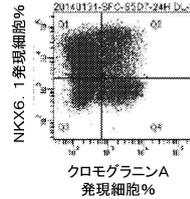
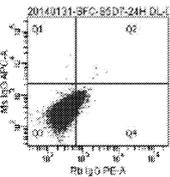
【図7B】

サンプルアイソタイプ
コントロール



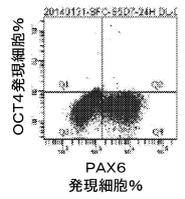
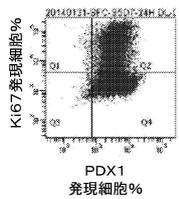
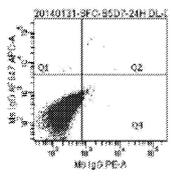
【図8A】

サンプルアイソタイプ
コントロール



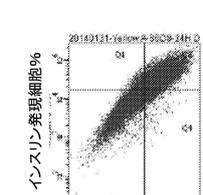
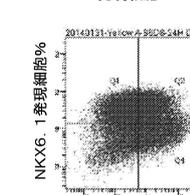
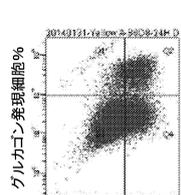
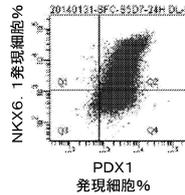
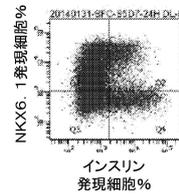
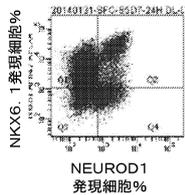
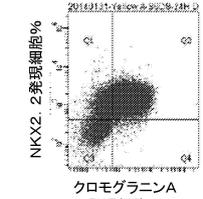
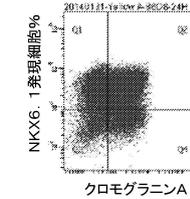
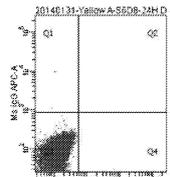
【図8B】

サンプルアイソタイプ
コントロール



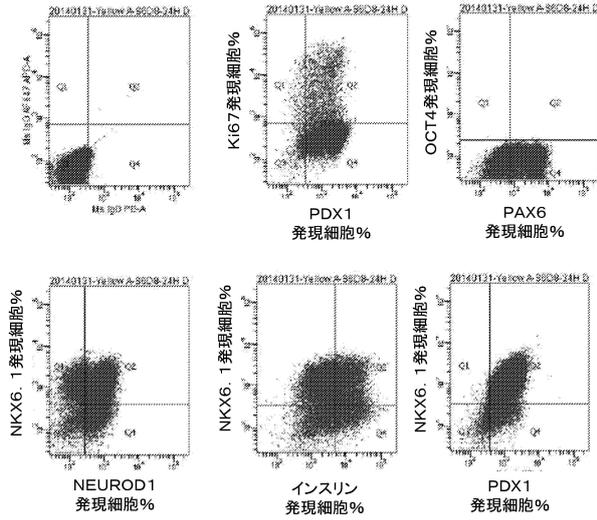
【図9A】

サンプルアイソタイプ
コントロール



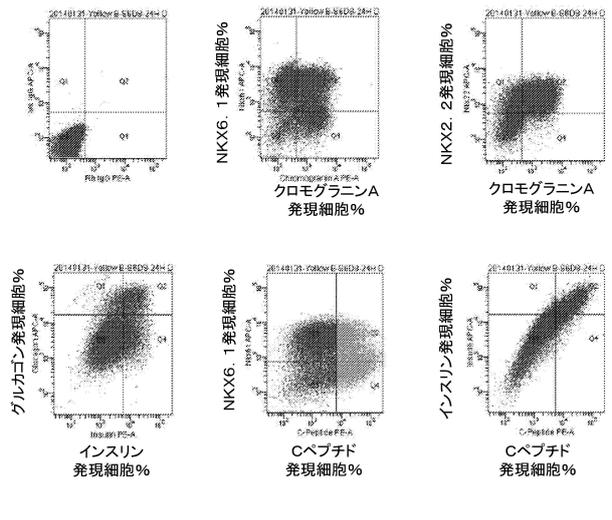
【図9B】

サンプルアイソタイプ
コントロール



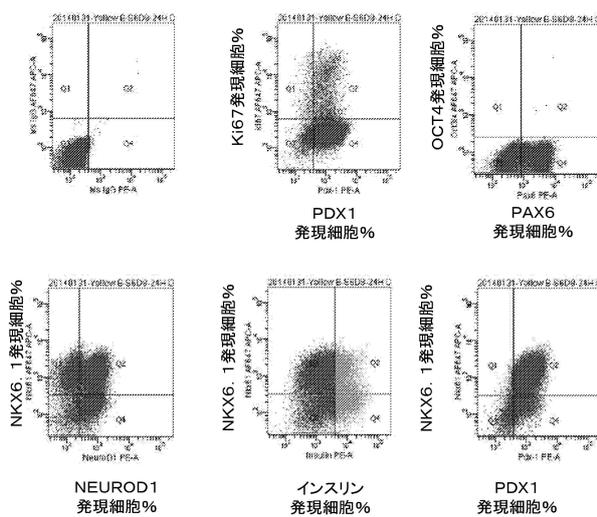
【図10A】

サンプルアイソタイプ
コントロール



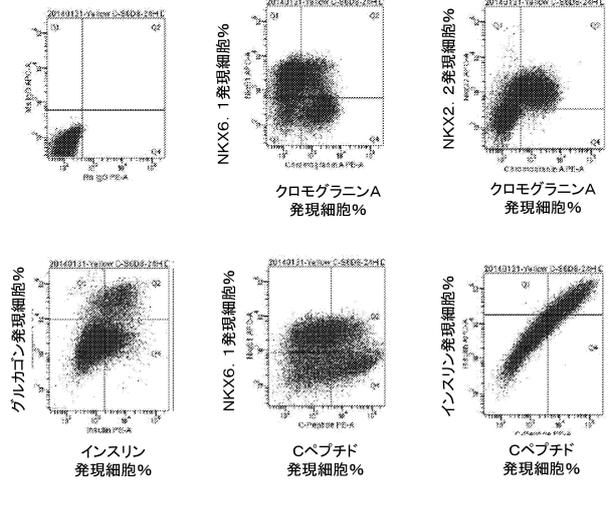
【図10B】

サンプルアイソタイプ
コントロール



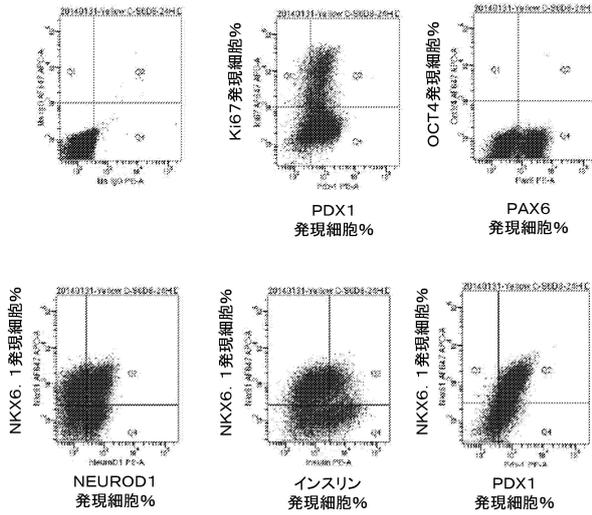
【図11A】

サンプルアイソタイプ
コントロール

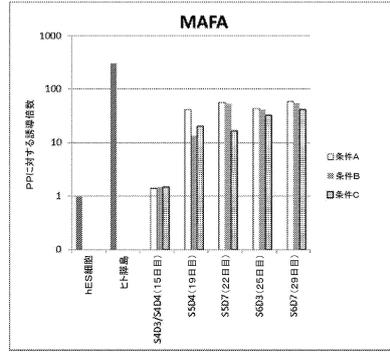


【図 1 1 B】

サンプルアイソタイプ
コントロール

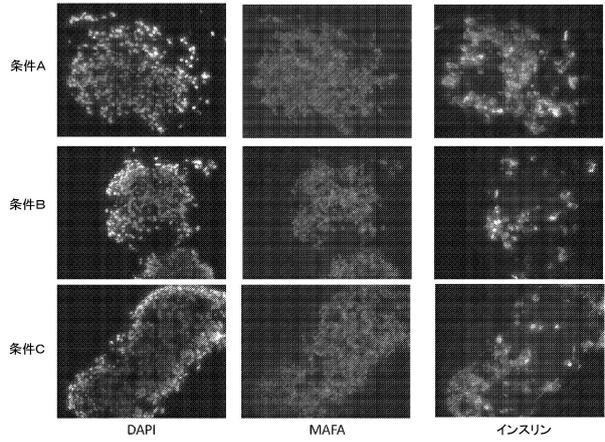


【図 1 2】

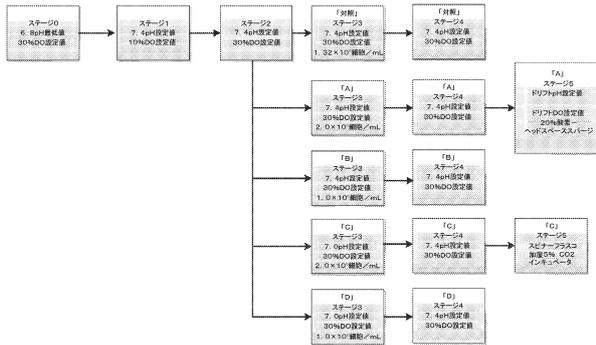


	MAFA Ct	GAPDH Ct
WA01-H1 HES	30.2	17.5
七転落島	23.2	18.8
条件A S4D3	32.5	20.3
条件B S4D3	31.6	19.4
条件C S4D4	32.3	20.2
条件A S6D4	26.4	19.5
条件B S6D4	26.6	19.6
条件C S6D4	27.7	19.1
条件A S6D7	26.6	19.3
条件B S6D7	26.7	19.3
条件C S6D7	26.8	19.1
条件A S6D7	27.0	19.7
条件B S6D7	28.2	19.3
条件C S6D7	28.5	20.1
条件A S4D3	25.7	18.9
条件B S4D3	26.0	19.0
条件C S4D4	26.7	19.4

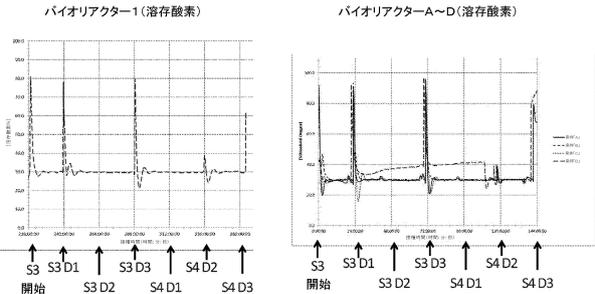
【図 1 3】



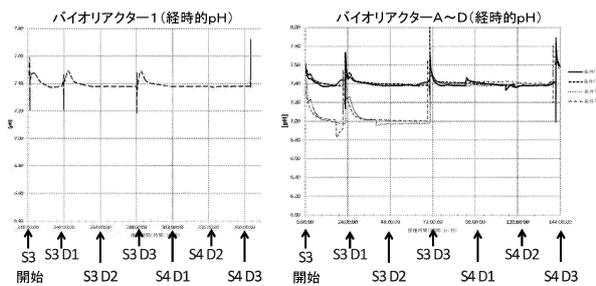
【図 1 4】



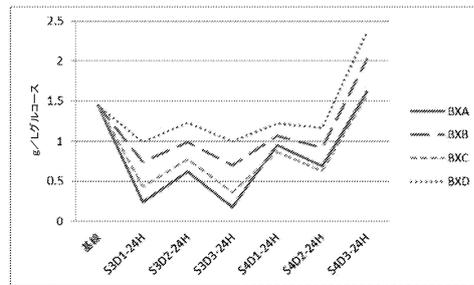
【図 1 5 B】



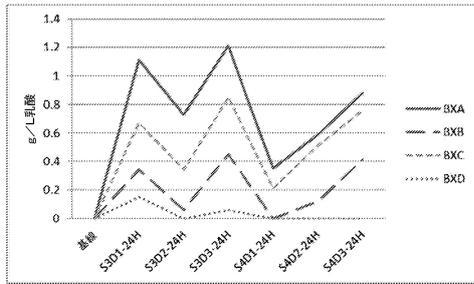
【図 1 5 A】



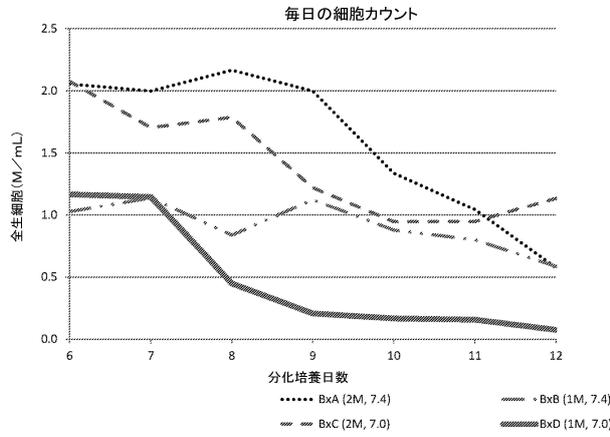
【図 1 6 A】



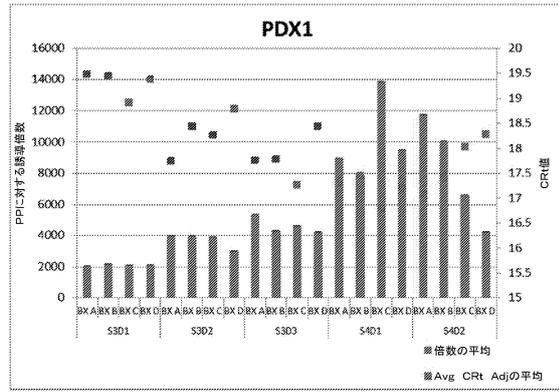
【 図 16 B 】



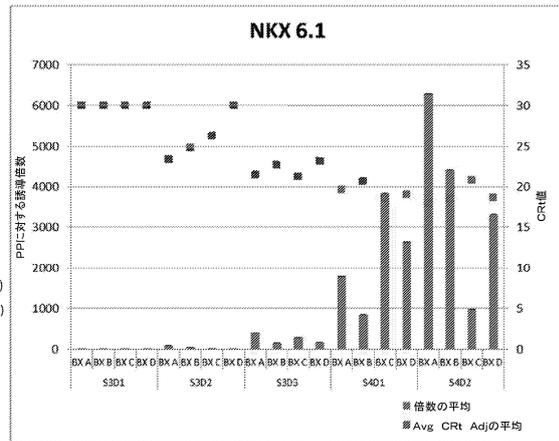
【 図 17 】



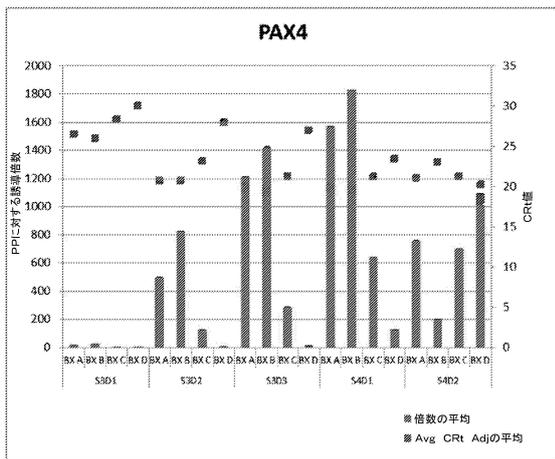
【 図 18 A 】



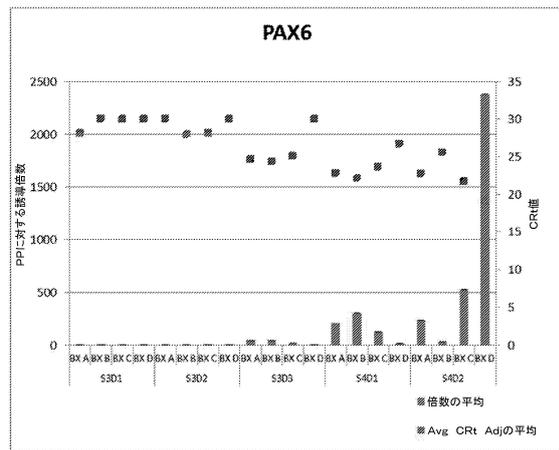
【 図 18 B 】



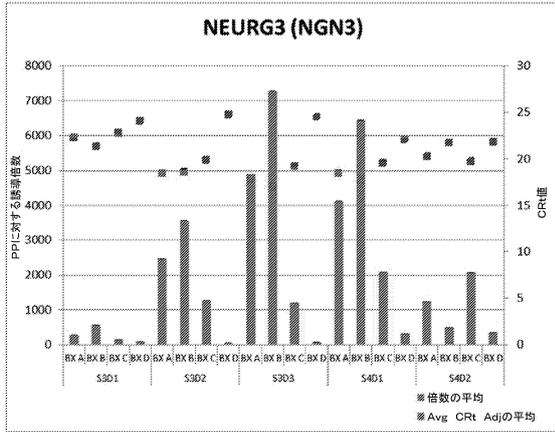
【 図 18 C 】



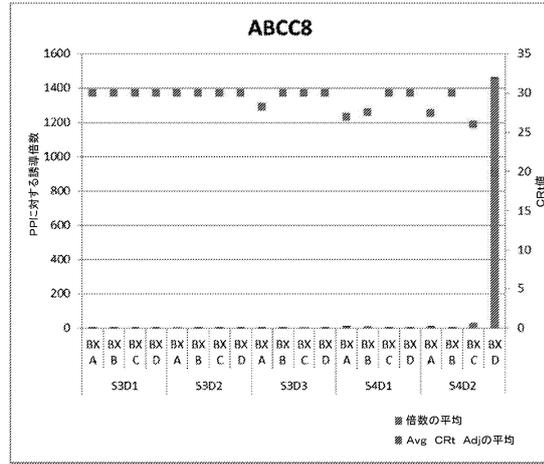
【 図 18 D 】



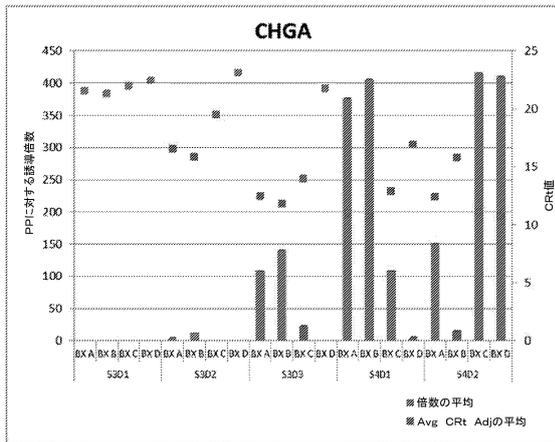
【 18 E 】



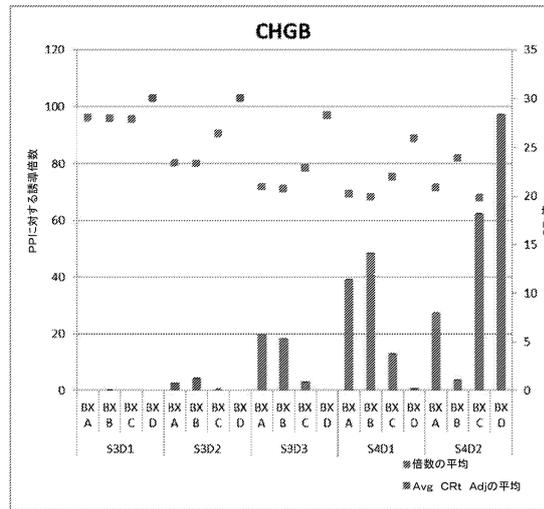
【 18 F 】



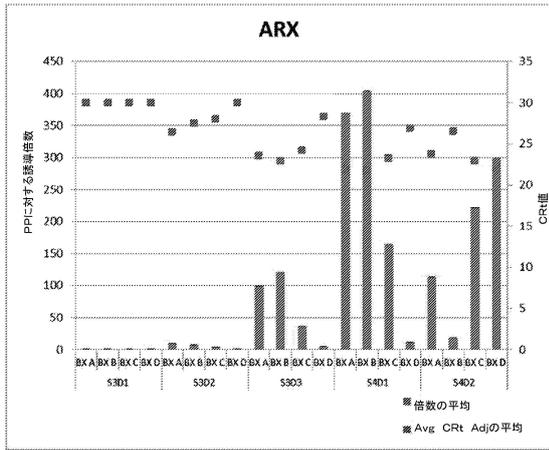
【 18 G 】



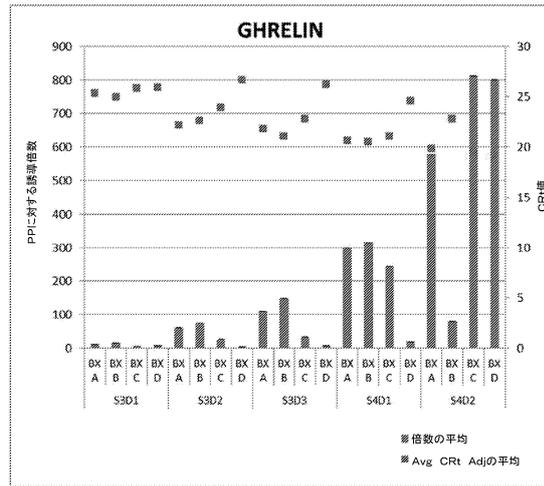
【 18 H 】



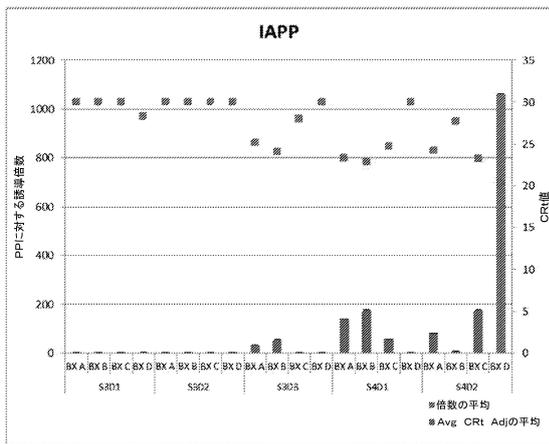
【 18 I 】



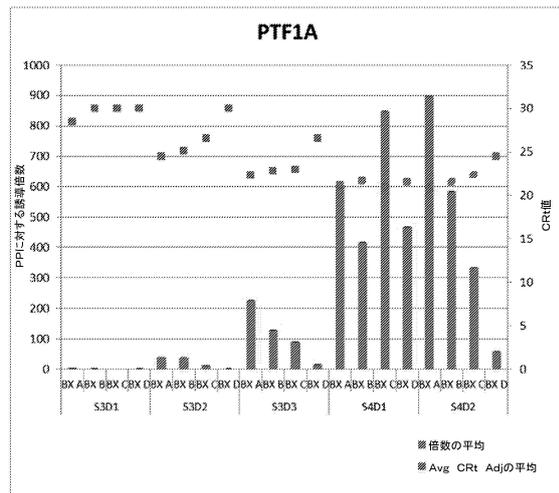
【 18 J 】



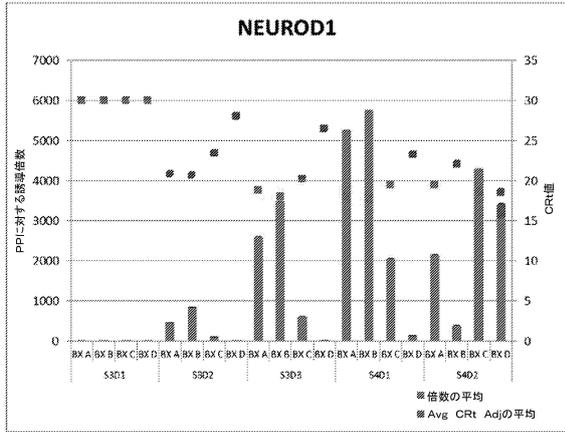
【 18 K 】



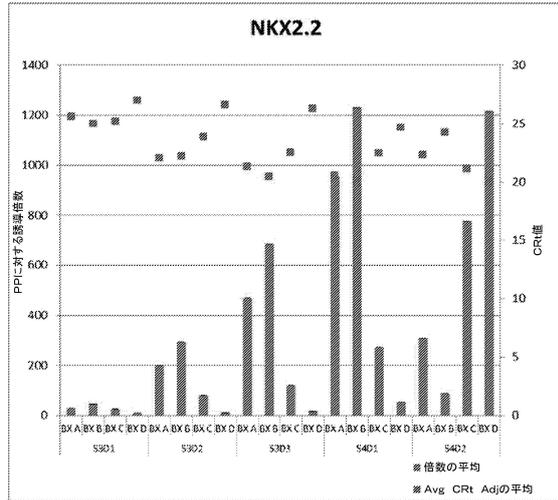
【 18 L 】



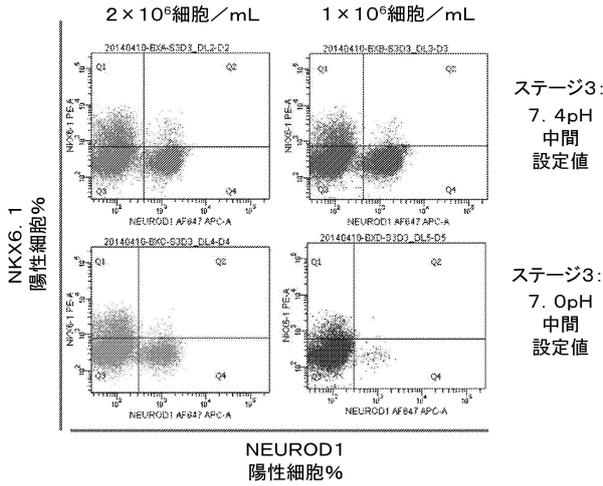
【 図 1 8 M 】



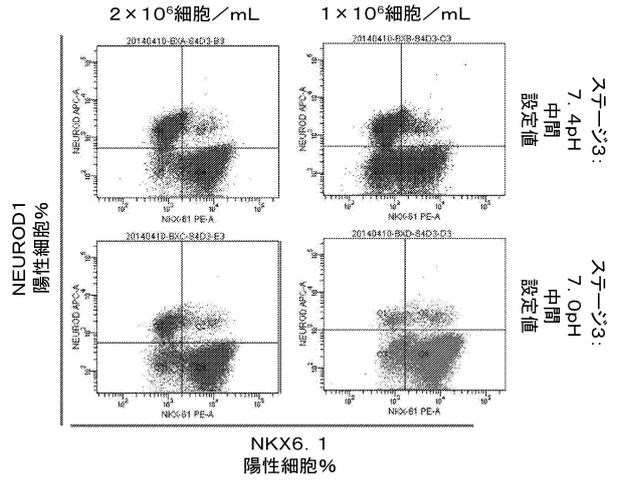
【 図 1 8 N 】



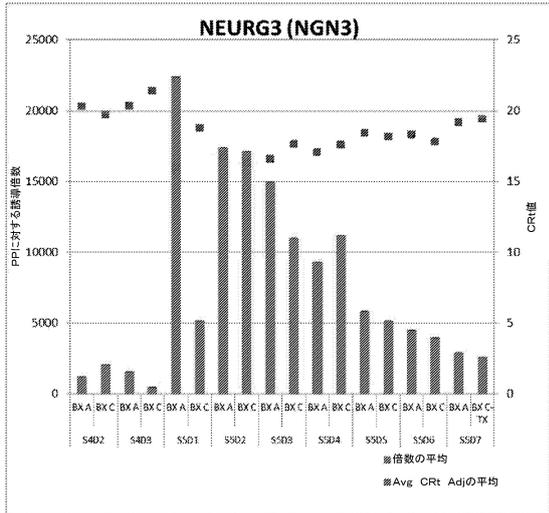
【 図 1 9 】



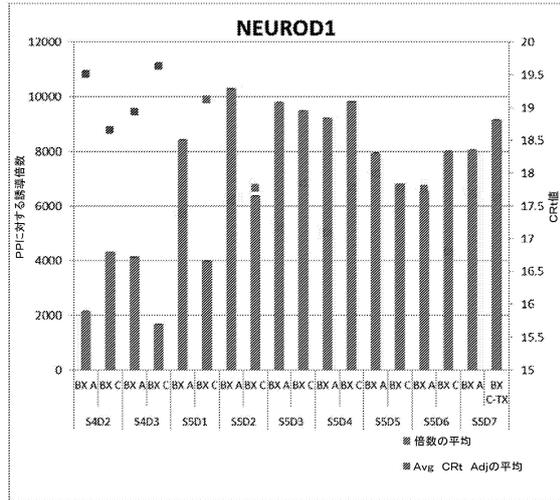
【 図 2 0 】



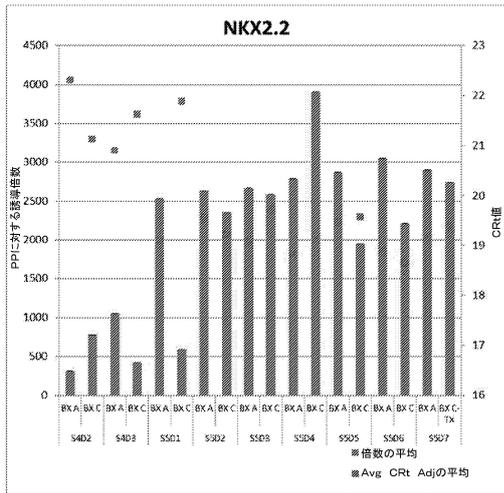
【 図 2 1 A 】



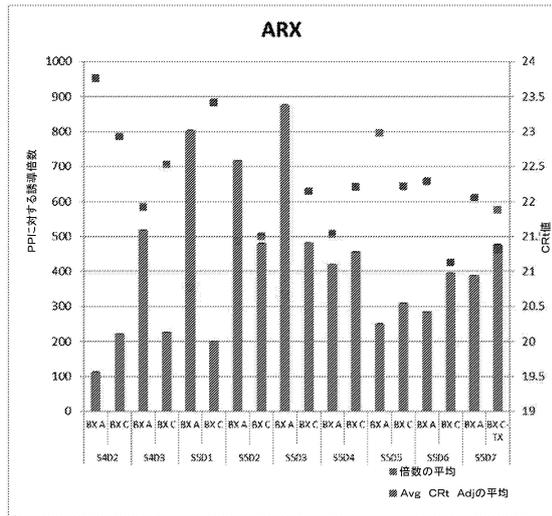
【 図 2 1 B 】



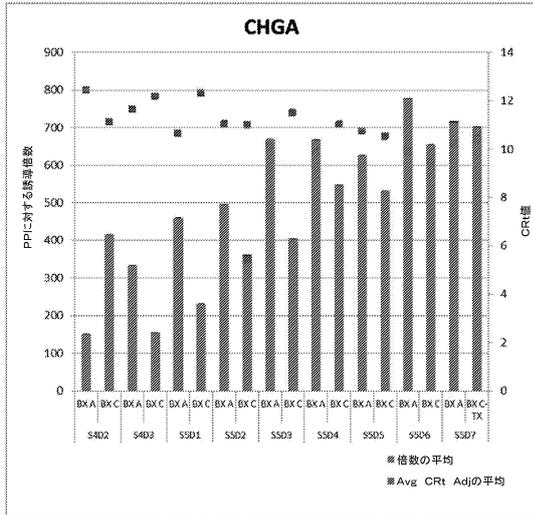
【 図 2 1 C 】



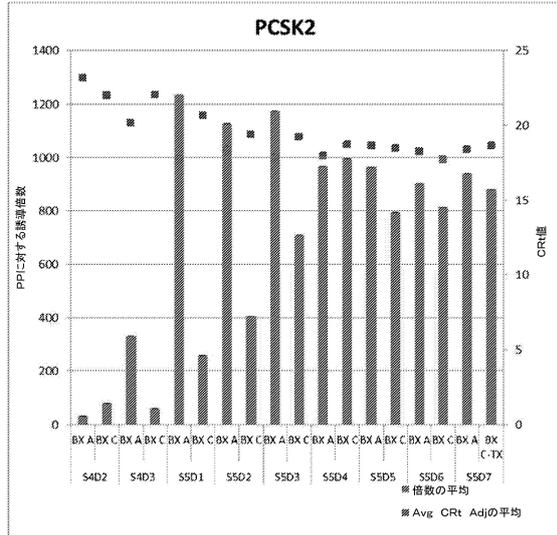
【 図 2 1 D 】



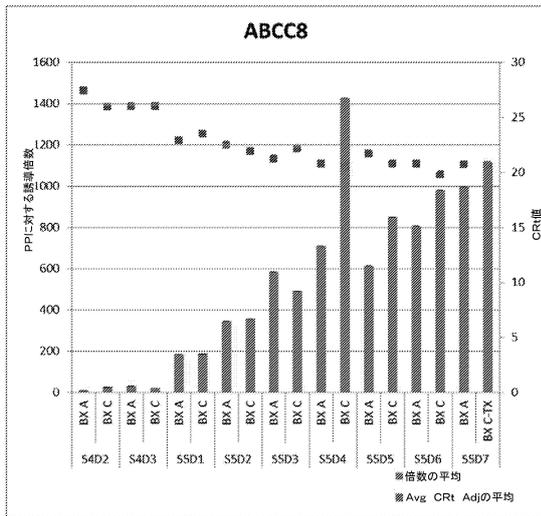
【 図 2 1 E 】



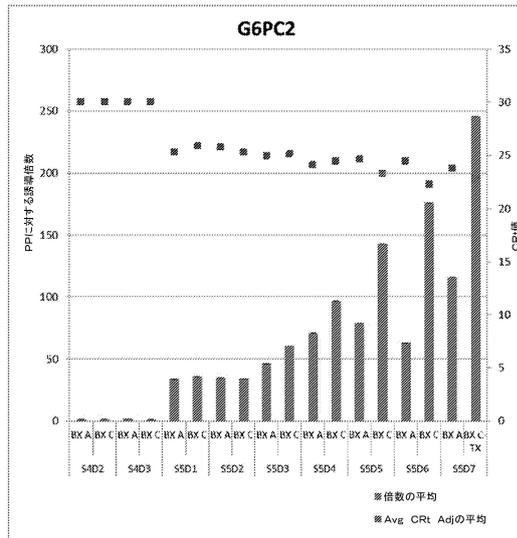
【 図 2 1 F 】



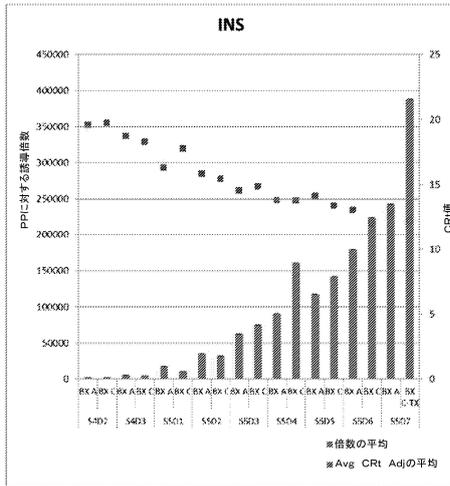
【 図 2 1 G 】



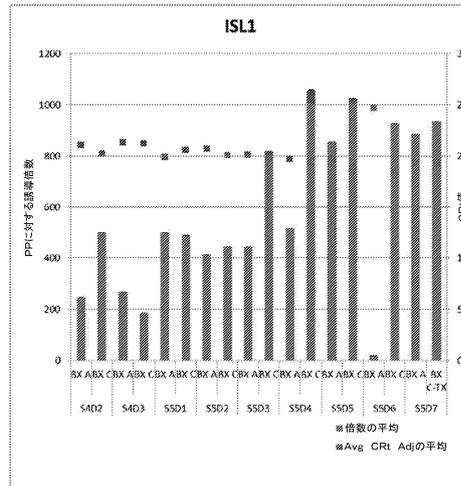
【 図 2 1 H 】



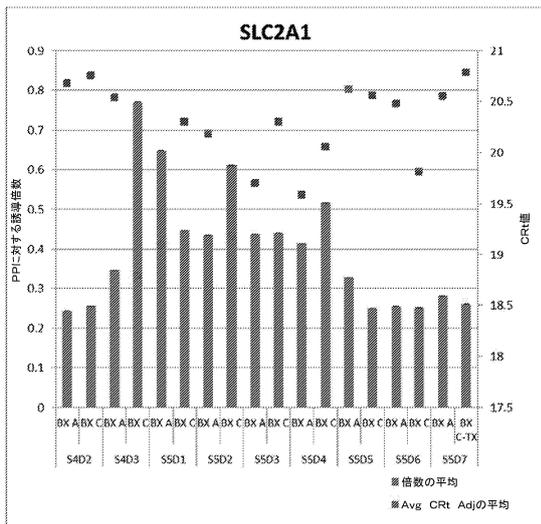
【図 2 1 I】



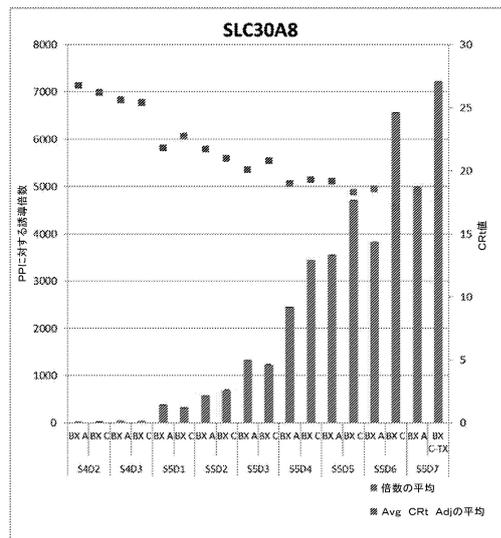
【図 2 1 J】



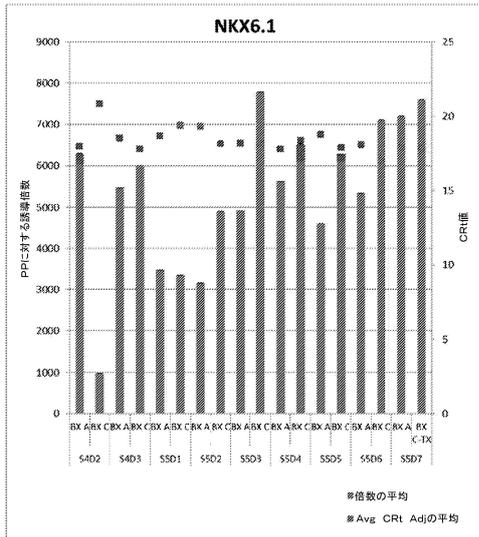
【図 2 1 K】



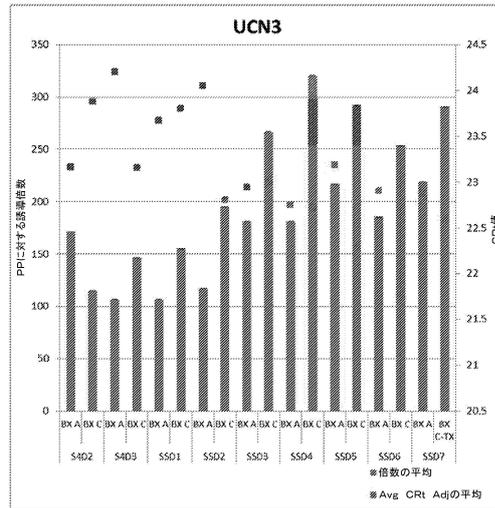
【図 2 1 L】



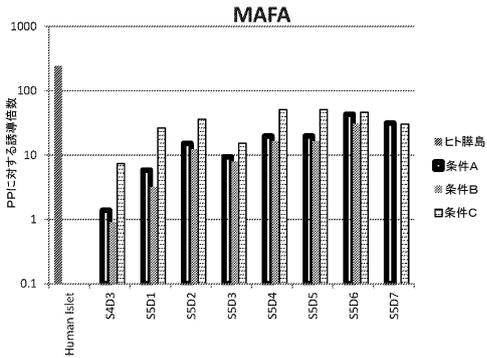
【 2 1 M 】



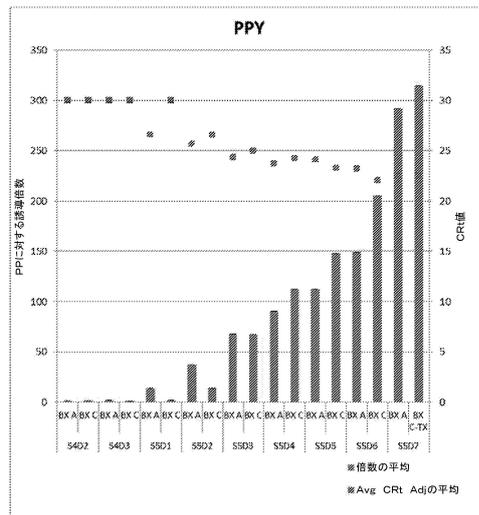
【 2 1 N 】



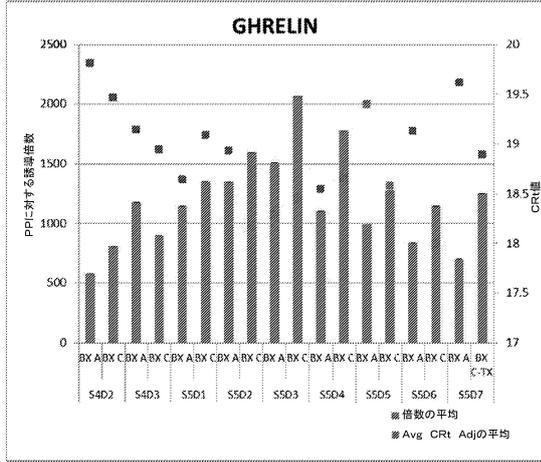
【 2 1 O 】



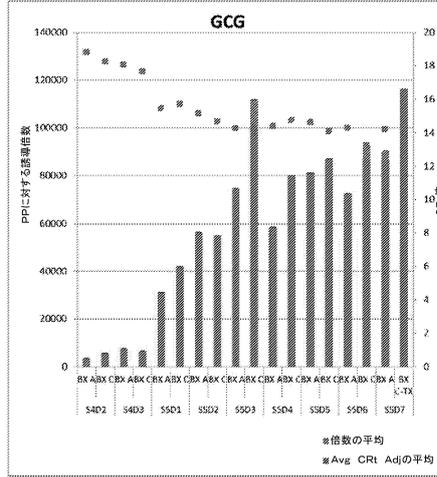
【 2 1 P 】



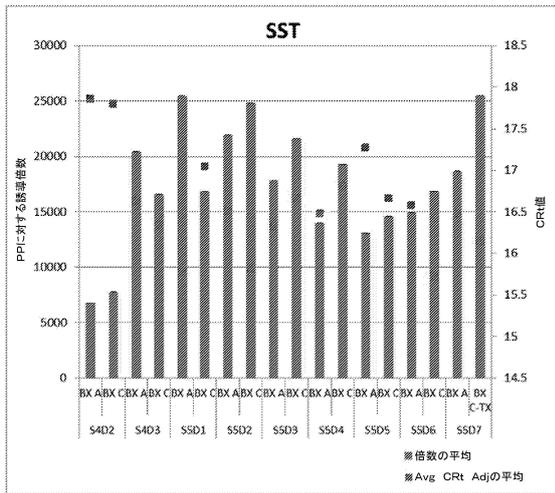
【図21Q】



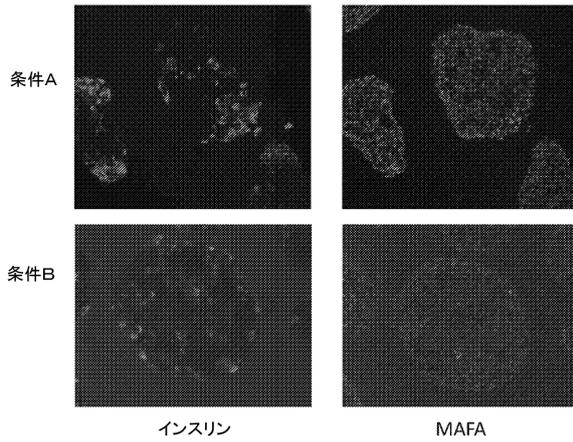
【図21R】



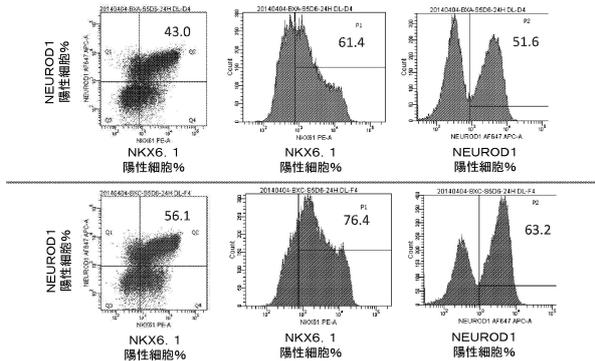
【図21S】



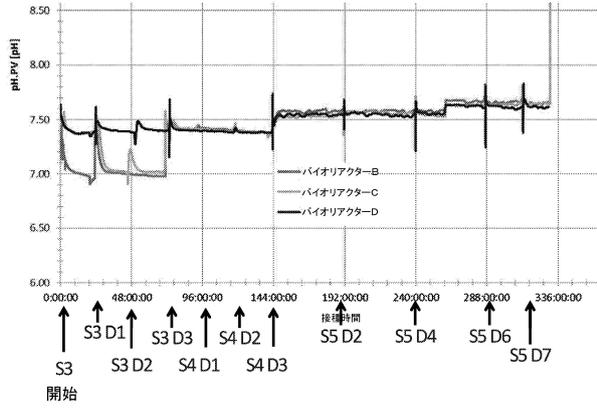
【図22】



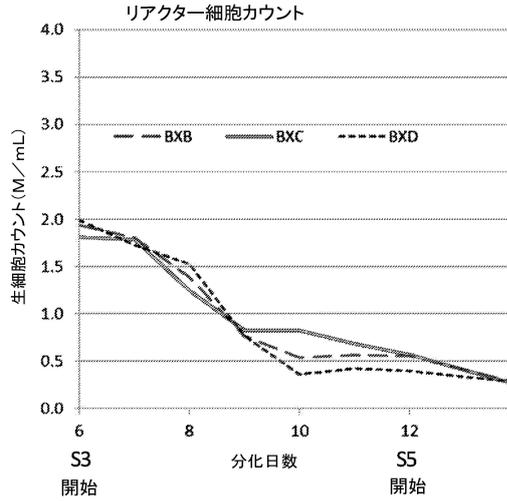
【図23】



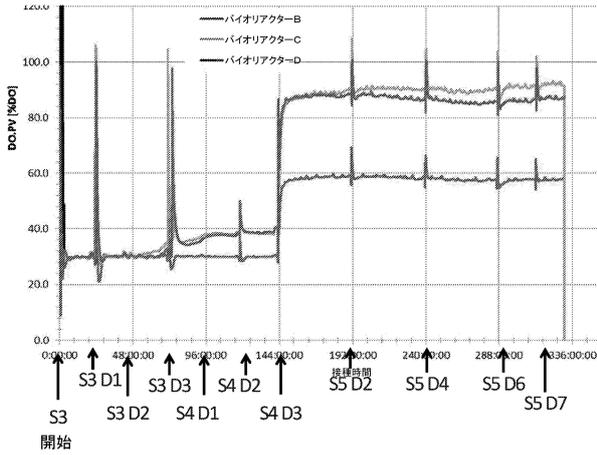
【図 2 4 A】



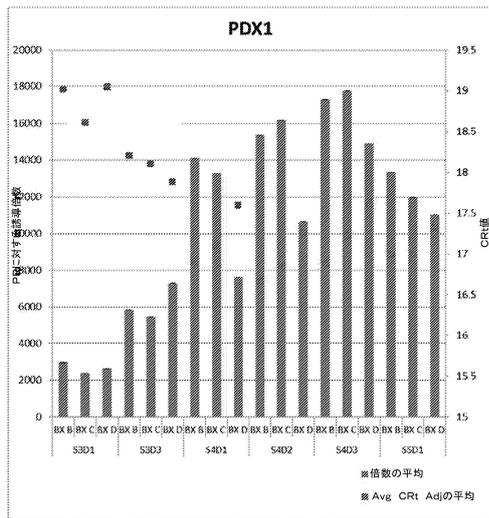
【図 2 5】



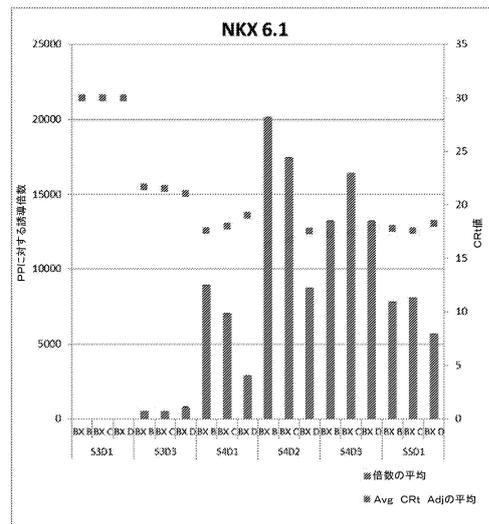
【図 2 4 B】



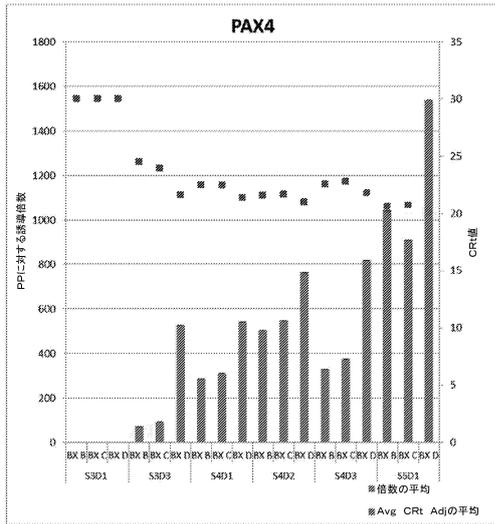
【図 2 6 A】



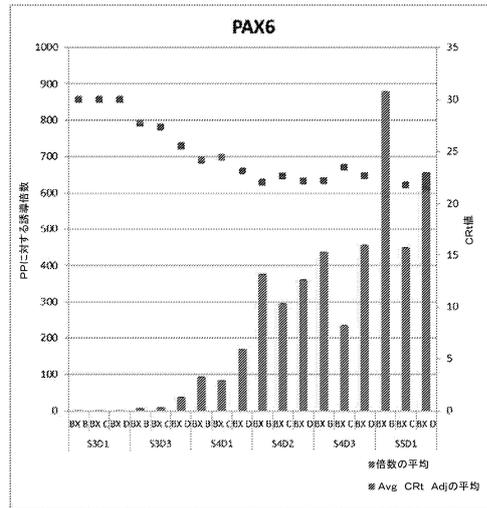
【図 2 6 B】



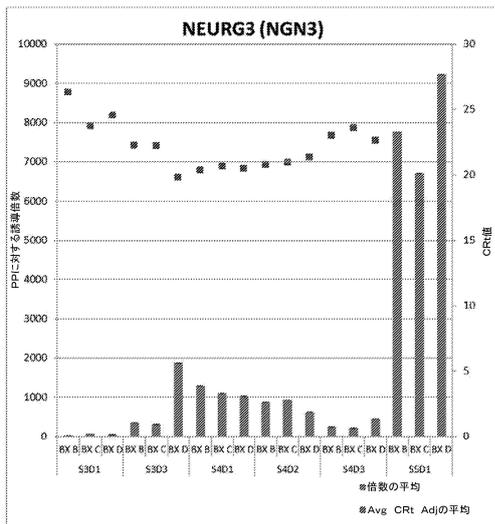
【 26C 】



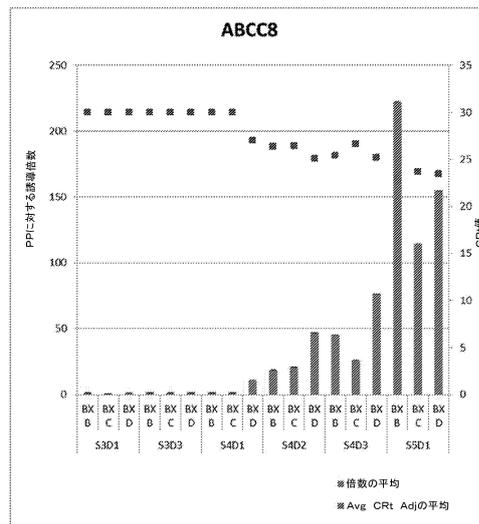
【 26D 】



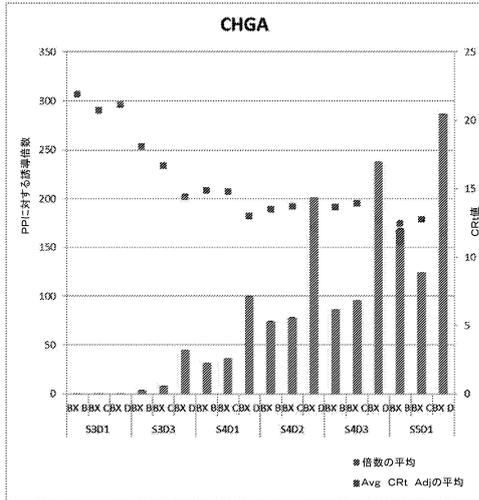
【 26E 】



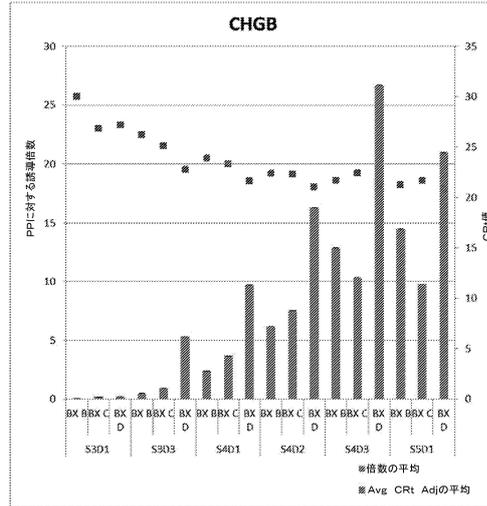
【 26F 】



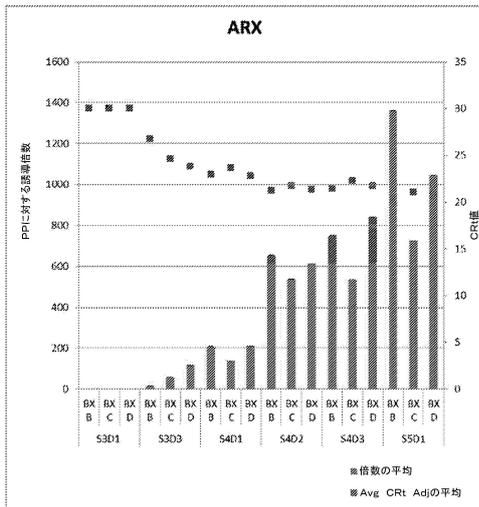
【 26 G 】



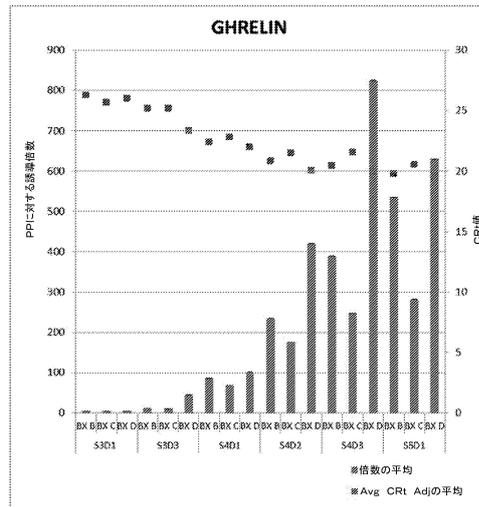
【 26 H 】



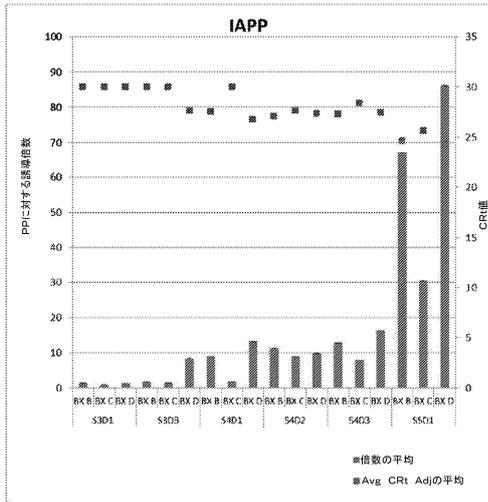
【 26 I 】



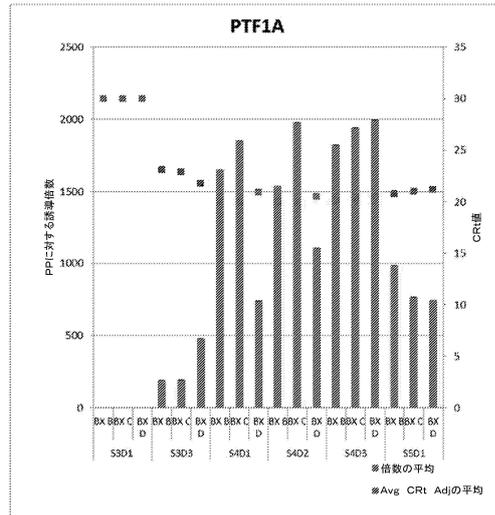
【 26 J 】



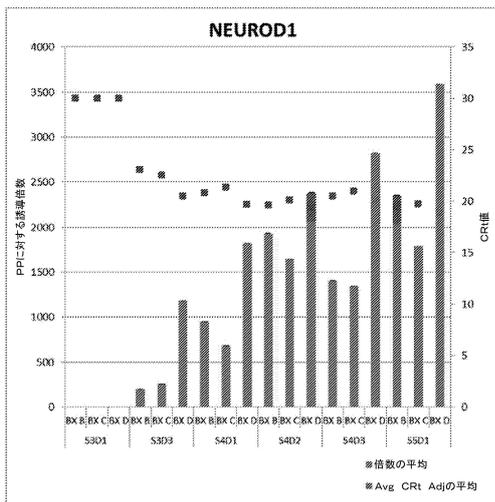
【 26 K 】



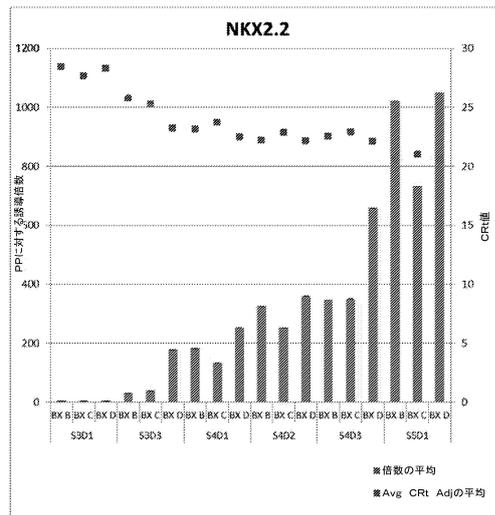
【 26 L 】



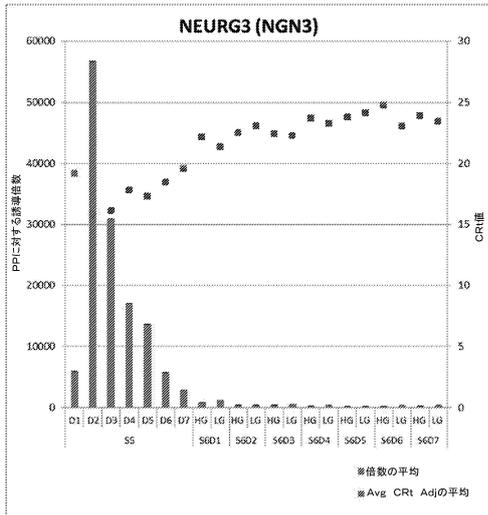
【 26 M 】



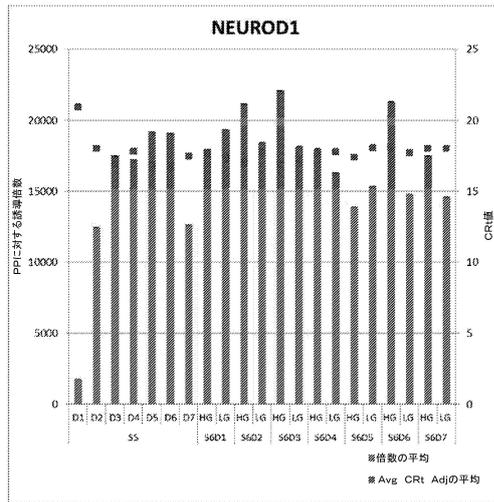
【 26 N 】



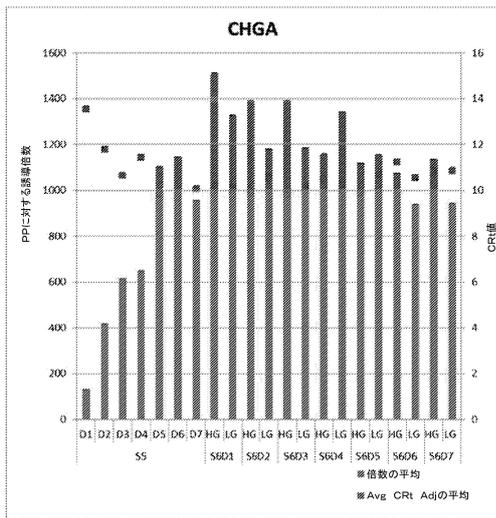
【 図 27 A 】



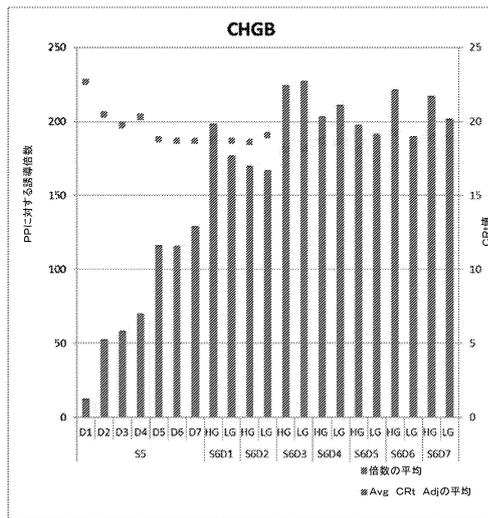
【 図 27 B 】



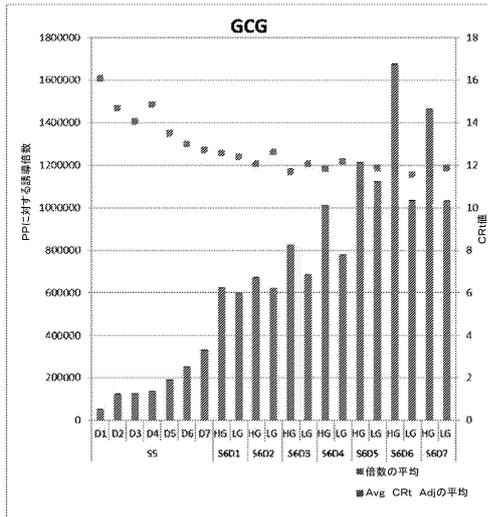
【 図 27 C 】



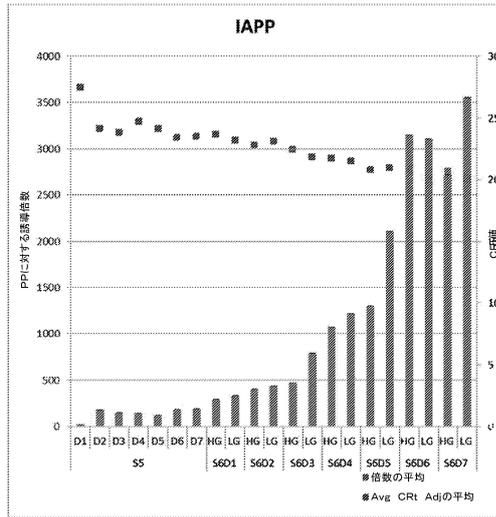
【 図 27 D 】



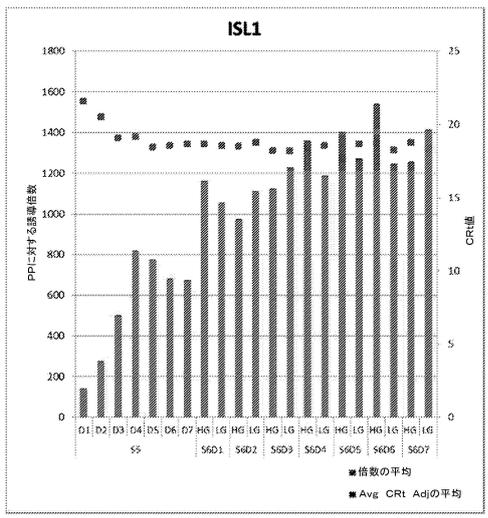
【図 27E】



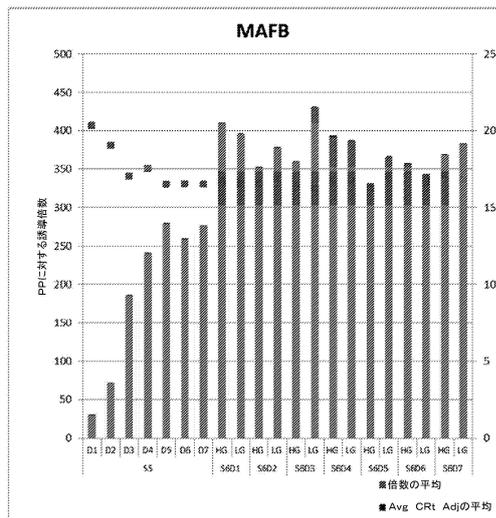
【図 27F】



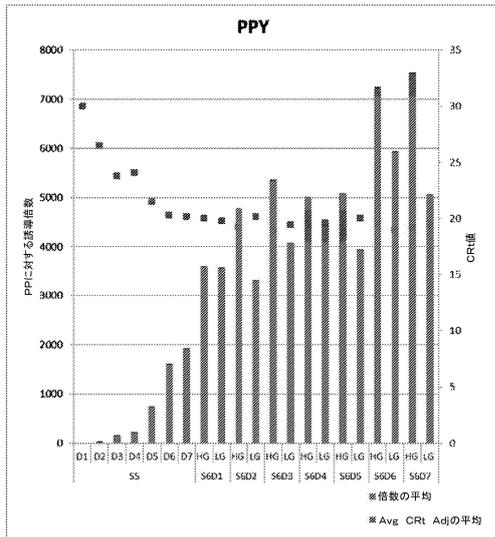
【図 27G】



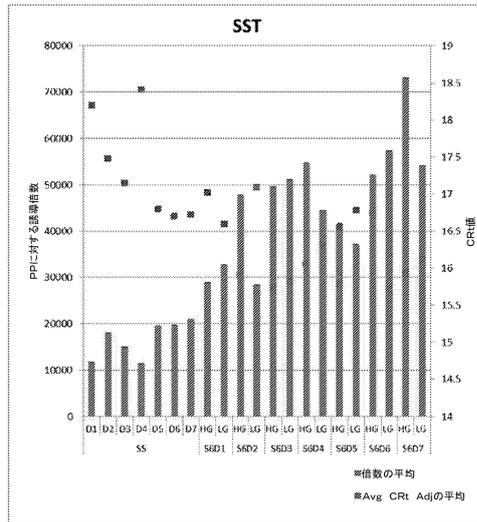
【図 27H】



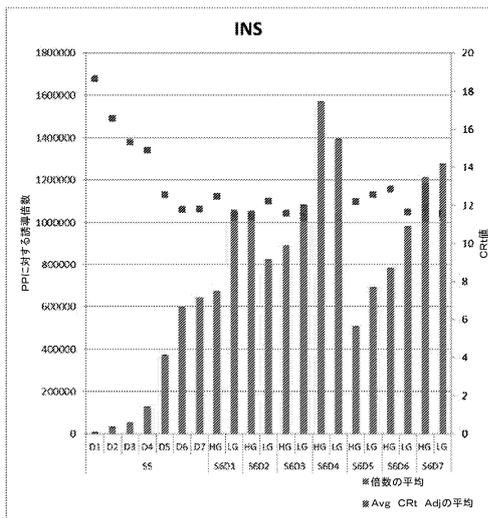
【 図 27 I 】



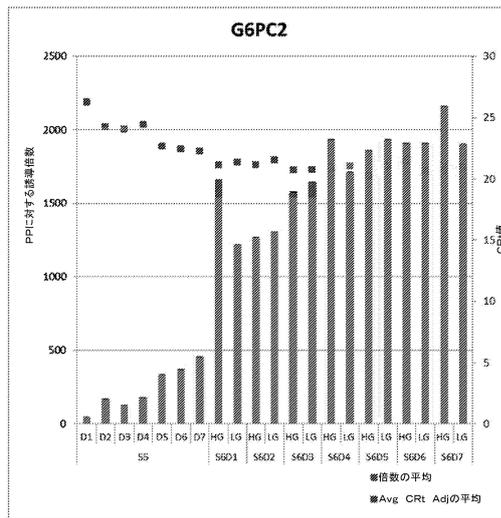
【 図 27 J 】



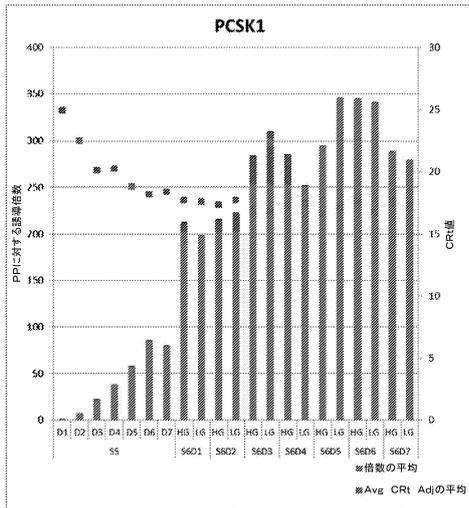
【 図 27 K 】



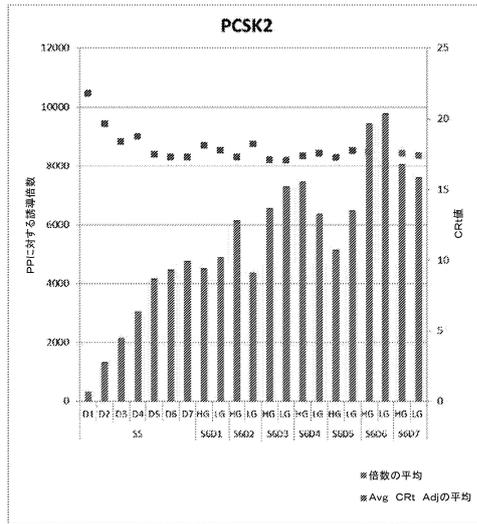
【 図 27 L 】



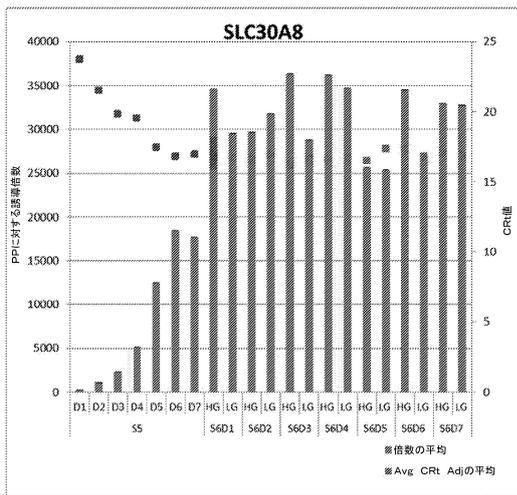
【 27M 】



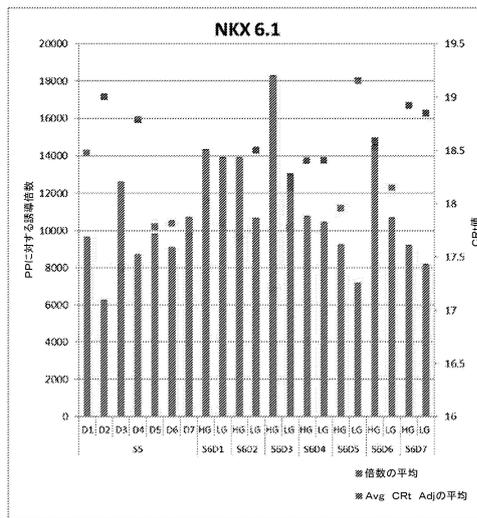
【 27N 】



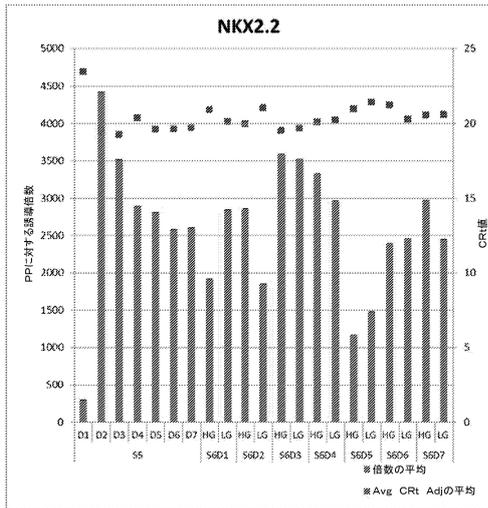
【 27O 】



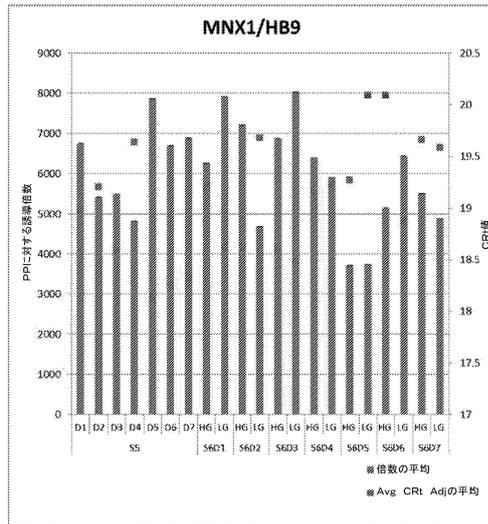
【 27P 】



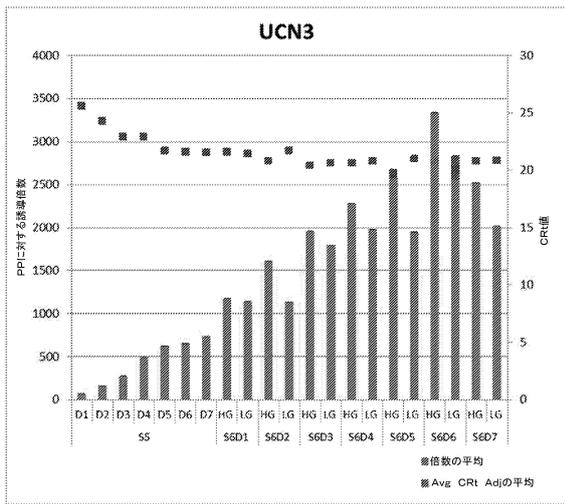
【 27Q 】



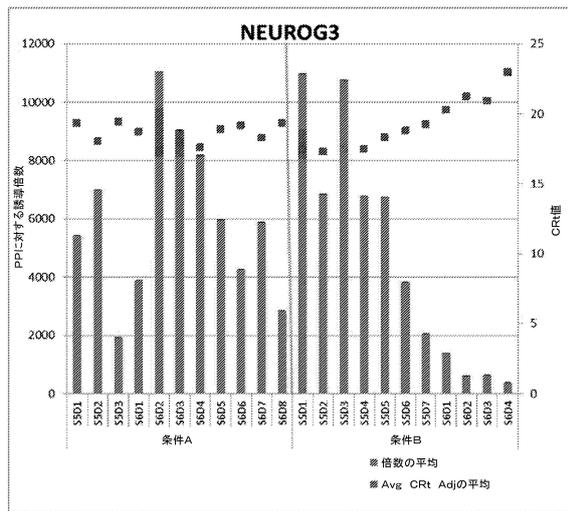
【 27R 】



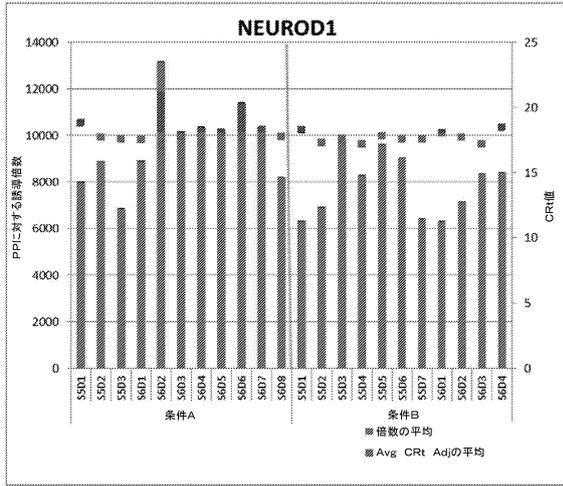
【 27S 】



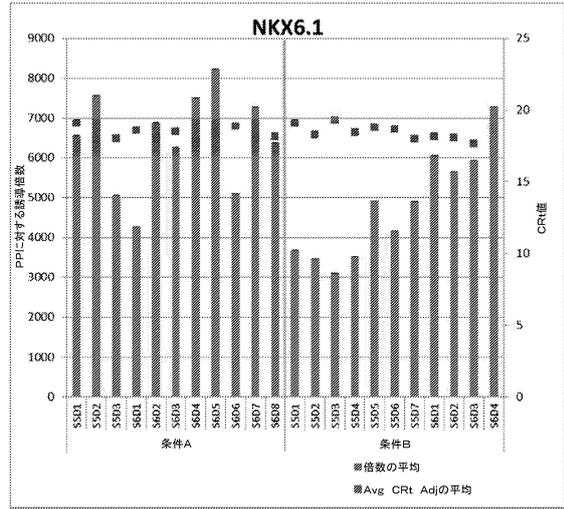
【 28A 】



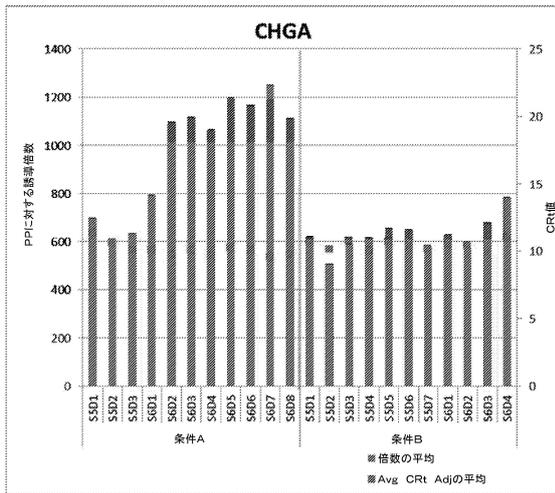
【 図 2 8 B 】



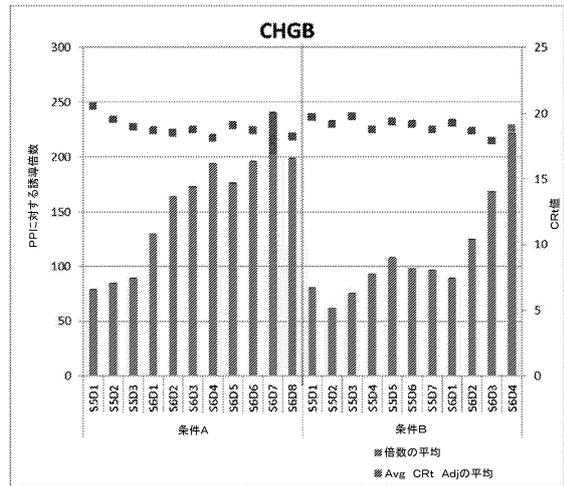
【 図 2 8 C 】



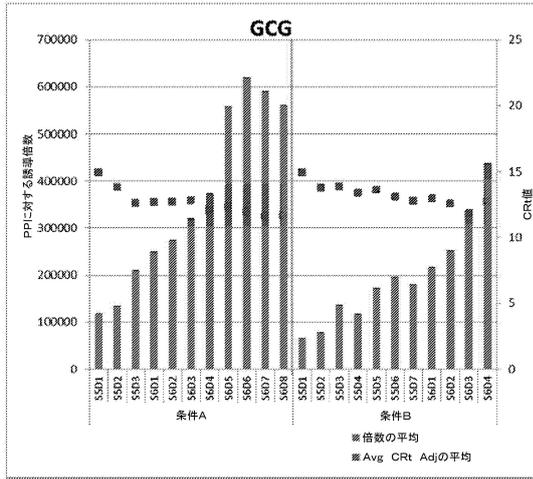
【 図 2 8 D 】



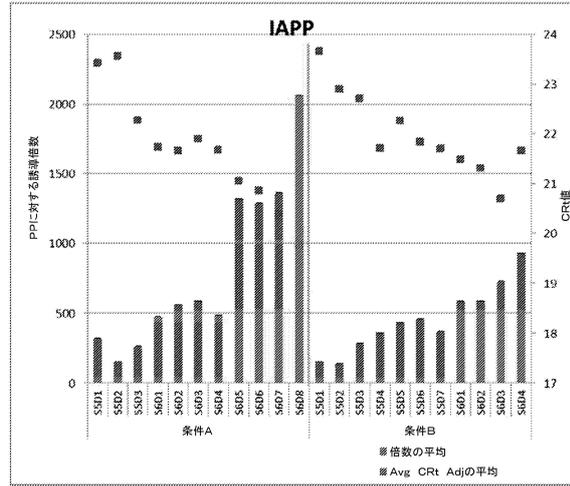
【 図 2 8 E 】



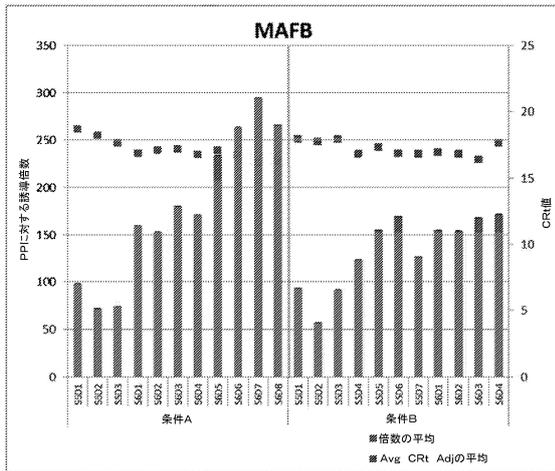
【 図 28 F 】



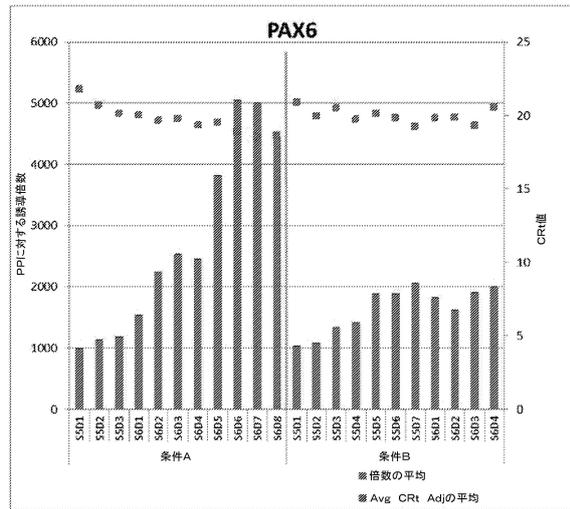
【 図 28 G 】



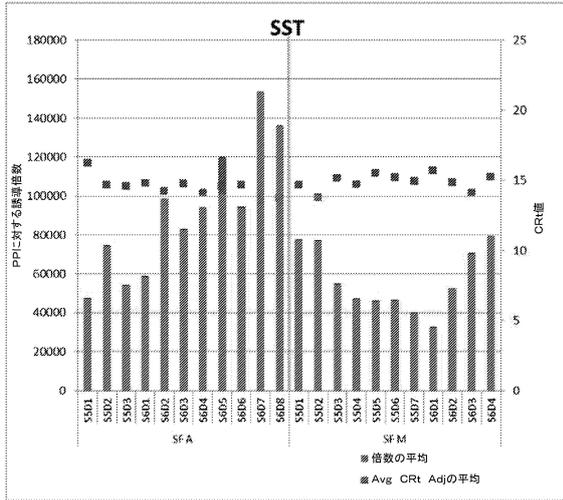
【 図 28 H 】



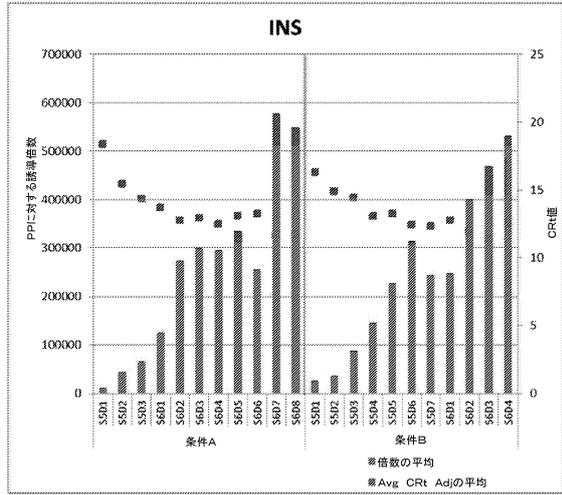
【 図 28 I 】



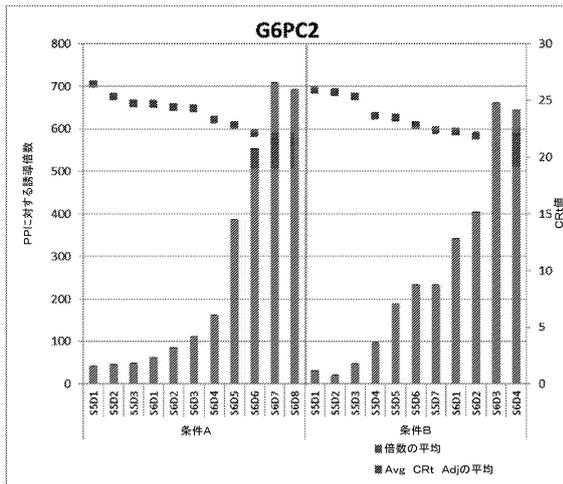
【 図 28 J 】



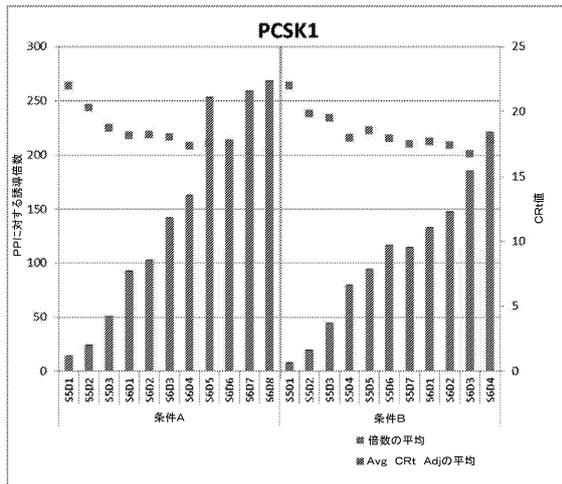
【 図 28 K 】



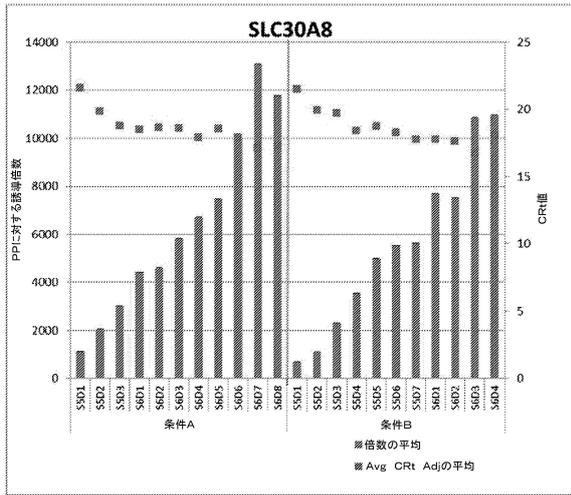
【 図 28 L 】



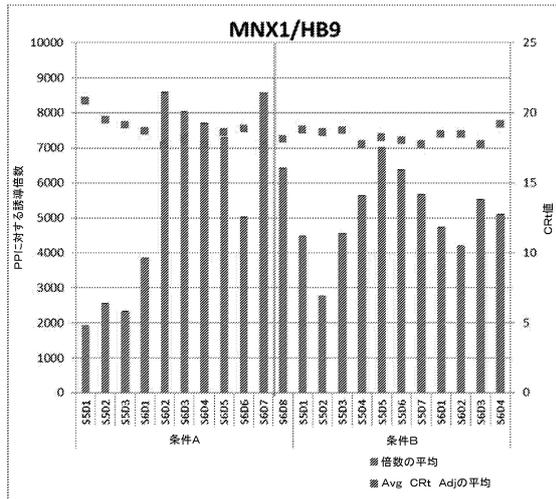
【 図 28 M 】



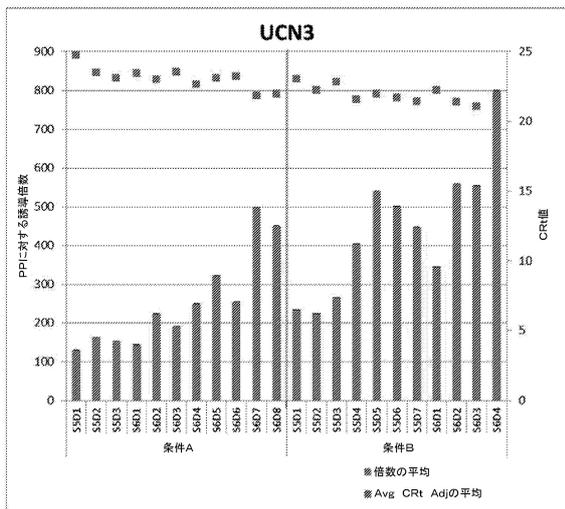
【 図 28 N 】



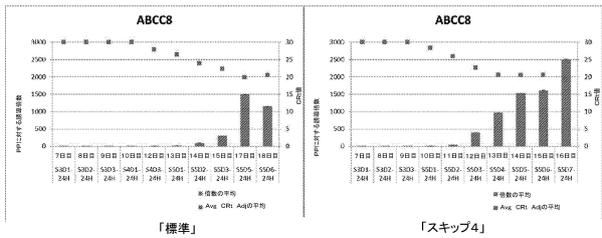
【 図 28 O 】



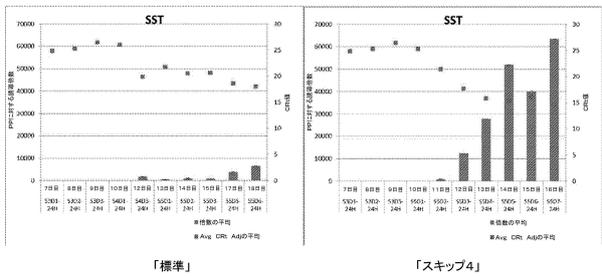
【 図 28 P 】



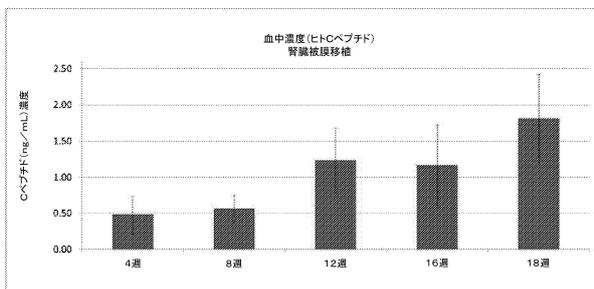
【 図 30 A 】



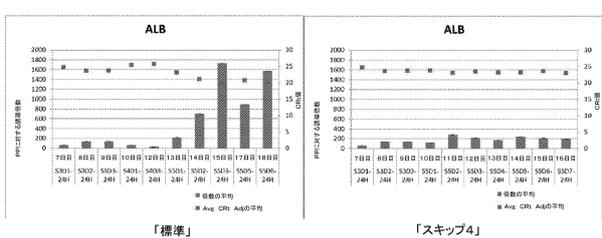
【 図 30 A - 1 】



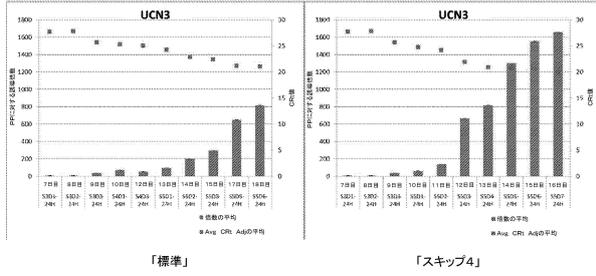
【 図 29 】



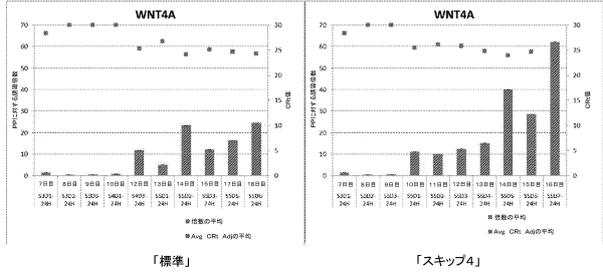
【 図 30 B 】



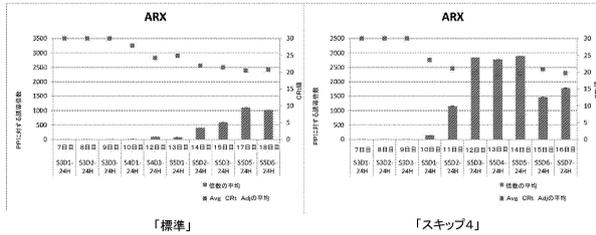
【**図 30B-1**】



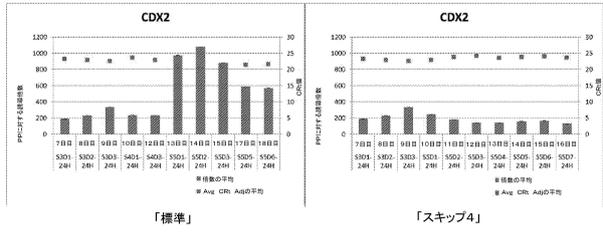
【**図 30C-1**】



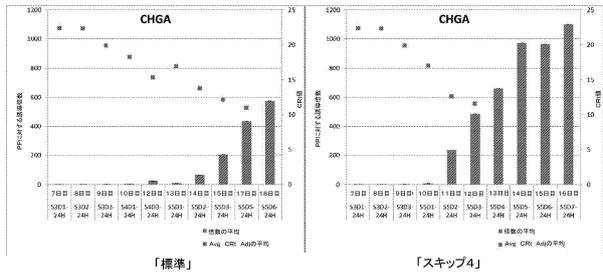
【**図 30C**】



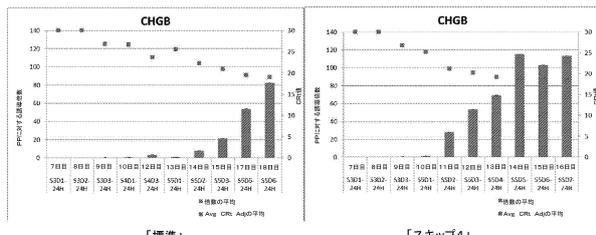
【**図 30D**】



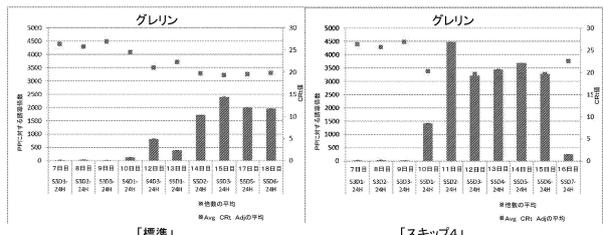
【**図 30E**】



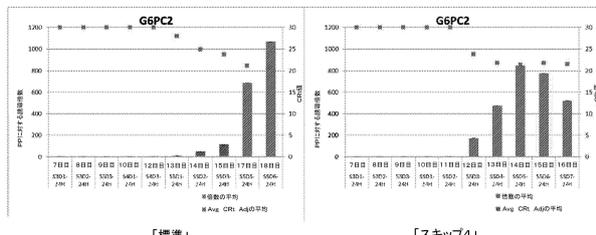
【**図 30F**】



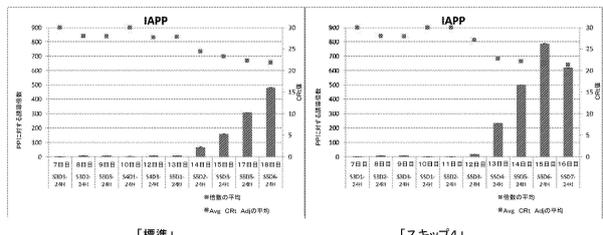
【**図 30I**】



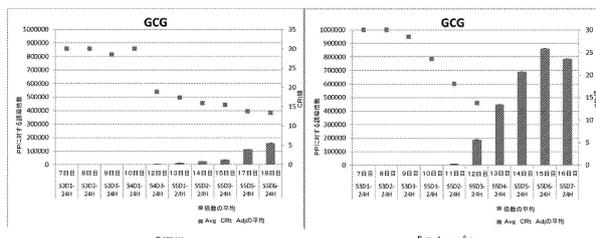
【**図 30G**】



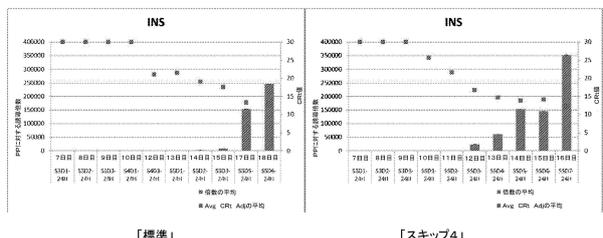
【**図 30J**】



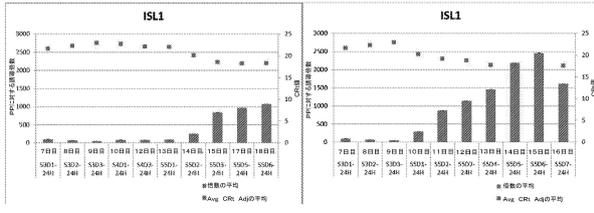
【**図 30H**】



【**図 30K**】



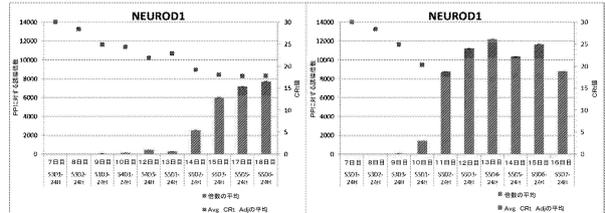
【 30 L 】



「標準」

「スキップ4」

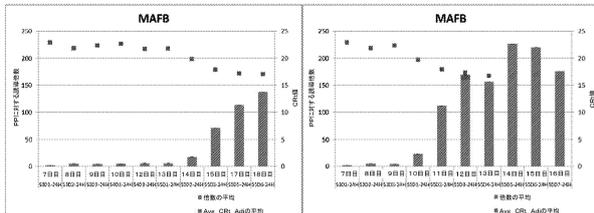
【 30 O 】



「標準」

「スキップ4」

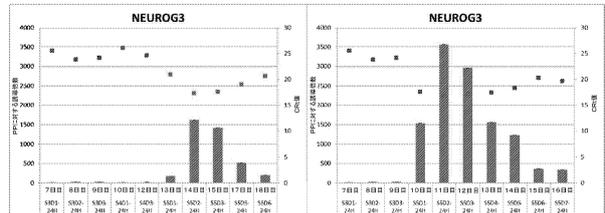
【 30 M 】



「標準」

「スキップ4」

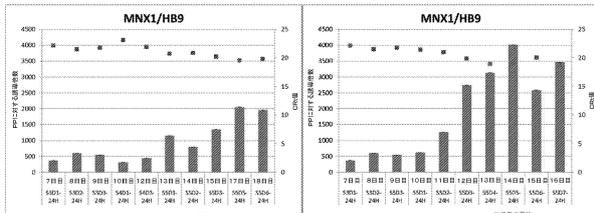
【 30 P 】



「標準」

「スキップ4」

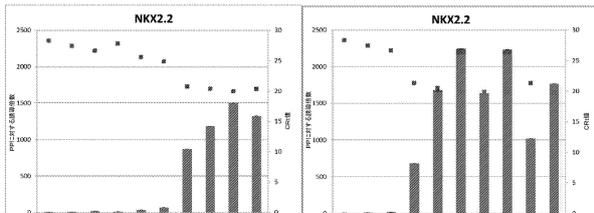
【 30 N 】



「標準」

「スキップ4」

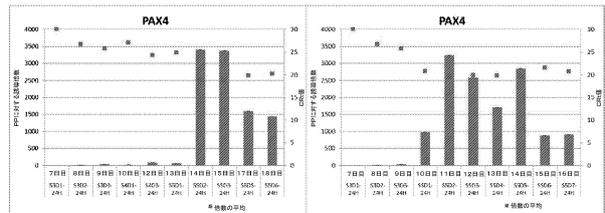
【 30 Q 】



「標準」

「スキップ4」

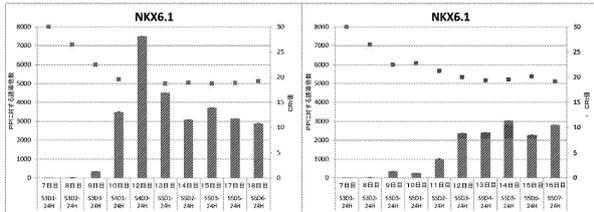
【 30 S 】



「標準」

「スキップ4」

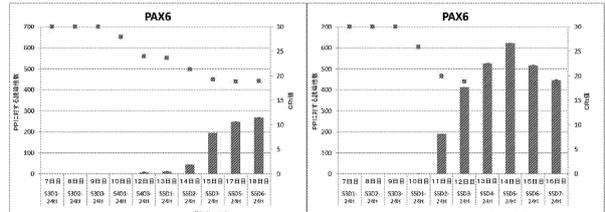
【 30 R 】



「標準」

「スキップ4」

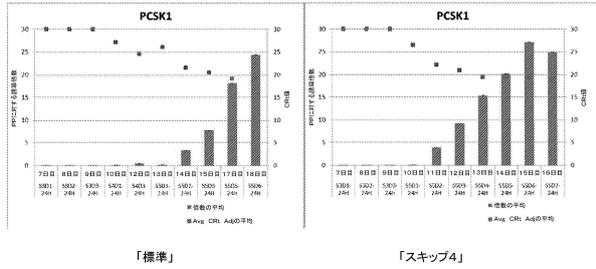
【 30 T 】



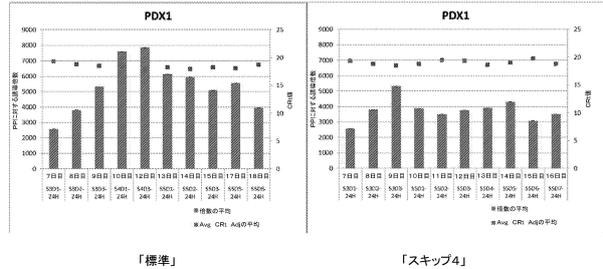
「標準」

「スキップ4」

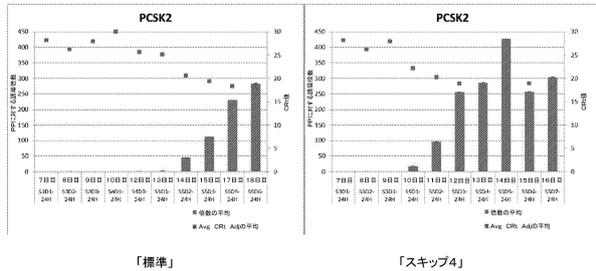
【図30U】



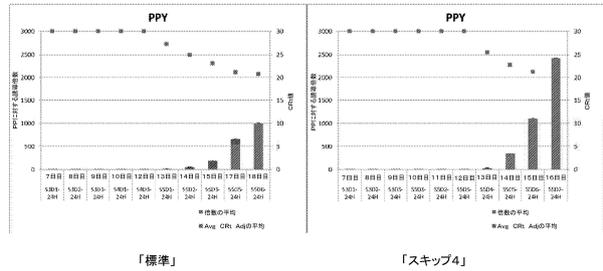
【図30W】



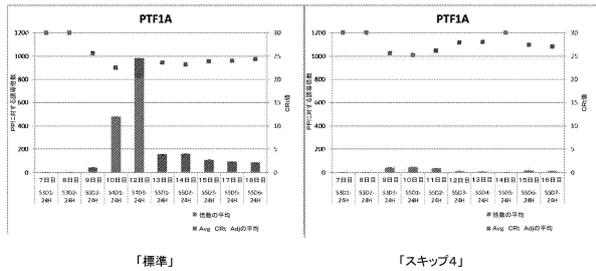
【図30V】



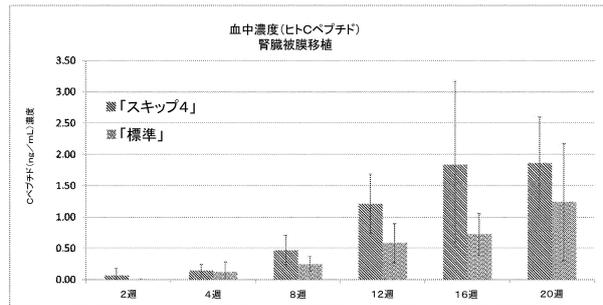
【図30X】



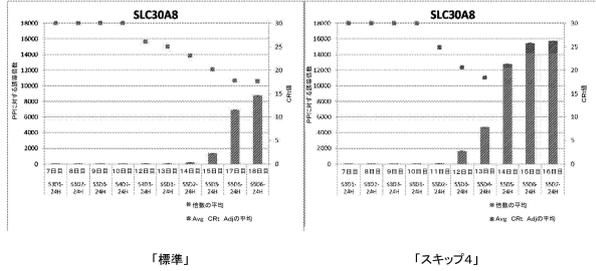
【図30Y】



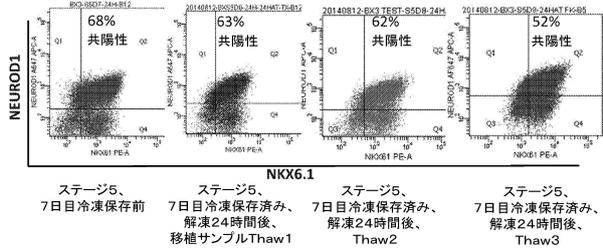
【図31】



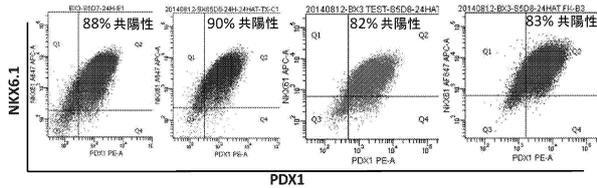
【図30Z】



【図32】



【図 3 3】



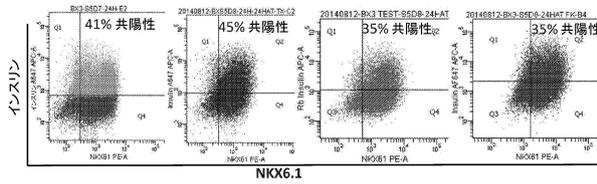
ステージ5、7日目冷凍前

ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、移植サンプルThaw1

ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、Thaw2

ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、Thaw3

【図 3 4】



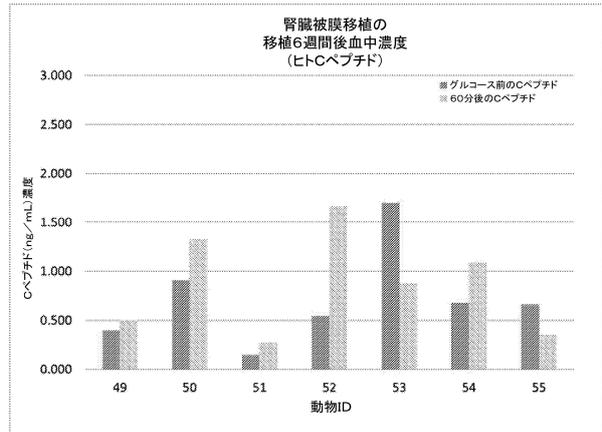
ステージ5、7日目冷凍前

ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、移植サンプルThaw1

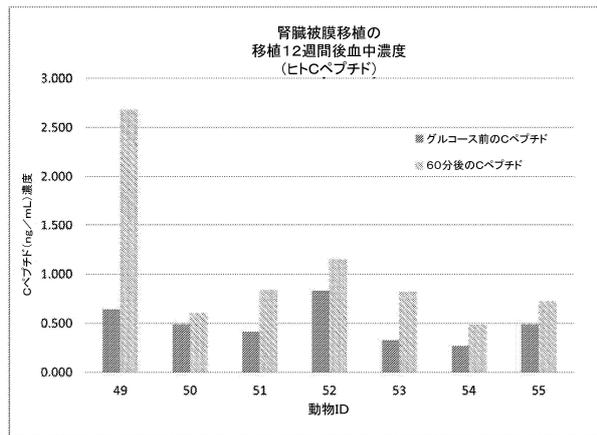
ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、Thaw2

ステージ5、7日目冷凍保存済み、解凍24時間後、Thaw3

【図 3 5】

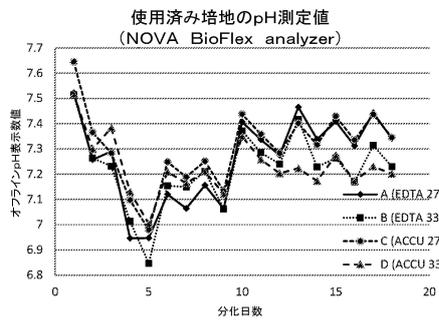


【図 3 6】

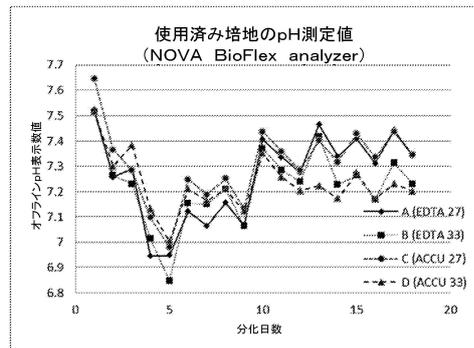


【図 3 7 A】

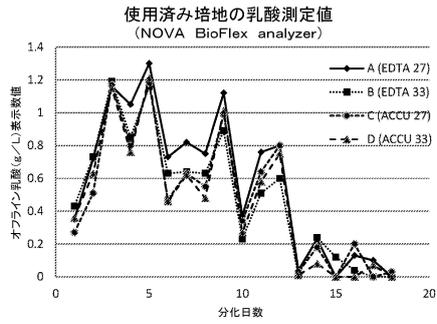
(ph)



【図 3 7 B】



【図38】



【図39】

ライブ/デッド撮像

	新鮮な細胞、SSD6の完了 (冷凍保存前)	解凍及び培養した冷凍保存済み SSD6細胞-24HAT
条件A (EDTA, 27RPM)		
条件B (EDTA, 33RPM)		
条件C (Accutase, 27RPM)		
条件D (Accutase, 33RPM)		

フロントページの続き

(74)代理人 100147131

弁理士 今里 崇之

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 フライヤーズ, ベンジャミン

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, 1000 ユーエス ルート 2
02 サウス

(72)発明者 ラニアウスカス, ダイナ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08869, ラリタン, 1000 ユーエス ルート 2
02 サウス

審査官 小林 薫

(56)参考文献 特表2009-528066(JP, A)

特表2011-526786(JP, A)

国際公開第2010/022395(WO, A2)

国際公開第2013/095953(WO, A1)

国際公開第2014/105546(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)